

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudios de la precipitación del bitartrato potásico en vinos
base para la elaboración de cavas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ignacio Correa Gorospe

Madrid, 2015

T66.0
COR

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Ingeniería Química

BIBLIOTECA UCM



5303516344

**ESTUDIO DE LA PRECIPITACION DEL
BITARTRATO POTASICO EN VINOS BASE PARA
LA ELABORACION DE CAVAS**

X-53-044271-9

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
N.º Registro <u>16504</u>

Ignacio Correa Gorospe

Madrid, 1990

Colección Tesis Doctorales. N.º 65/90

© Ignacio Correa Gorospe

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria
Madrid, 1990
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-1210-1990**

Autor: IGNACIO CORREA GOROSPE

ESTUDIO DE LA PRECIPITACION DEL BITARTRATO POTASICO EN
VINOS BASE PARA LA ELABORACION DE CAVAS

Directores: MARIA DEL CARMEN POLO SANCHEZ RAFAEL RODRIGUEZ CLEMENTE

Investigadores Científicos

del

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Ingeniería Química

1989

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES

MUSEO NACIONAL DE CIENCIAS NATURALES

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Dña. María del Carmen Polo Sanchez y del Dr. D Rafael Rodríguez Clemente, Investigadores Científicos del C.S.I.C., a quienes expreso mi más sincero agradecimiento, por su inestimable ayuda. También agradezco al Dr. D Jose M Brusí, Profesor Titular del Departamento de Química Industrial de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, por haber aceptado ser Ponente de esta Tesis.

Asimismo agradezco a las Dras. Dña. María Dolores Cabezudo Ibañez, Dña. Concepción Llaguno Marchena y Dña. Mercedes Ramos Gonzalez, Profesoras de Investigación del C.S.I.C., su apoyo y el haber podido contar con sus puntos de vista en el enfoque de aspectos importantes del trabajo.

También a los Dres. Dña. María Teresa Hernandez, D. Eduardo Rodríguez Badiola y D. Sabino Veintemillas Verdaguer, Colaboradores Científicos del C.S.I.C., su ayuda en el montaje experimental y en el empleo de la instrumentación analítica. A la Dra. Isabel Cáceres por su colaboración en el análisis de aminoácidos y a D. José Luis Andreu su valiosa ayuda en los análisis convencionales de vinos.

Quiero hacer constar mi agradecimiento a todos mis compañeros del Museo Nacional de Ciencias Naturales (antes Instituto de Geología) y del Instituto de Fermentaciones Industriales, que con su ayuda han colaborado en la realización de esta Tesis.

Por último, quiero agradecer a la Caja de Ahorros de Madrid y a la firma Codorniu S.A., la financiación recibida y sin la que no hubiera podido llevar a cabo esta Tesis.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION GENERAL	1
CAPITULO 1.	
EL ACIDO TARTARICO Y EL POTASIO EN EL VINO. REVISION DE METODOS PARA LA ESTABILIZACION DEL VINO RESPECTO AL BITARTRATO POTASICO.	
1.1 EL ACIDO TARTARICO Y EL POTASIO EN EL VINO	7
1.2. ESTABILIZACION DE LOS VINOS FRENTE A LAS PRECIPITACIONES TARTARICAS	15
1.2.1 Técnicas de estabilización que manteniendo la sobresaturación evitan la aparición de cristales	20
1.2.2 Técnicas de estabilización que evitan la precipitación al eliminar alguno de los iones precipitantes	23
1.2.2.1 Resinas de intercambio iónico	23
1.2.2.2 Electrodialisis	24
1.2.2.3 Osmosis inversa	26
1.2.3 Técnicas de estabilización que eliminan la sobresaturación provocando la precipitación	28
1.2.3.1 Sistema de estabilización tradicional	29
1.2.3.2 Sistema Vinipal	32
1.2.3.3 Sistema Crystal Flow	33
1.2.3.4 Sistema de contacto	35
1.3 CONCLUSIONES	40
CAPITULO 2.	
CINETICA DE LA CRISTALIZACION: ASPECTOS TEORICOS.	
2.1 SOBRESATURACION	41
2.2 SOLA METAESTABLE	43
2.3 NUCLEACION	44
2.3.1 Barrera energética de la nucleación homogénea	45
2.3.2 Barrera energética para la nucleación heterogénea	47
2.3.3 Barrera energética para la nucleación secundaria	48
2.4 PERIODO DE INDUCCION Y VELOCIDAD DE NUCLEACION	48

2.5 CRECIMIENTO CRISTALINO	50
2.6 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO	52
2.7 CINÉTICA DE LA PRECIPITACION	54
2.8 INFLUENCIA DE LOS PARAMETROS EXPERIMENTALES	55
2.8.1 Sobresaturación	56
2.8.2 Temperatura	56
2.8.3 Agitación	57
2.8.4 Efecto del tamaño del cristal	58

CAPITULO 3.

FISICO-QUÍMICA DE LAS SOLUCIONES TARTÁRICAS.

3.1 SOLUBILIDAD DEL KHT	61
3.1.1 Constantes de disociación del ácido tartárico	63
3.1.2 Cálculo del porcentaje de bitartrato en las soluciones	64
3.1.3 Fuerza iónica de los vinos	64
3.1.4 Coeficientes de actividad	68
3.1.5 Producto de solubilidad y producto de concentraciones	68
3.1.6 Cálculo de la sobresaturación	71
3.1.7 Estudio de la interdependencia del tamaño de grano y la solubilidad del KHT en soluciones agua-alcohol	71
3.1.8 Criterio para la elección del tamaño de grano de los cristales de KHT en las experiencias con siembra	74
3.2 RELACION ENTRE LA CONDUCTIVIDAD ELECTRICA DE LAS SOLUCIONES HIDROALCOHOLICAS DE KHT Y DEL VINO CON LA CONCENTRACION	74
3.2.1 Material y métodos	75
3.2.1.1 Muestras	75
3.2.1.2 Medida de la conductividad	75
3.2.1.3 Determinación de potasio	75
3.2.1.4 Control de la temperatura	75
3.2.2 Resultados y discusión	76
3.3. CONCLUSIONES	81

CAPITULO 4.

ESTUDIO DE LA PRECIPITACION DEL BITARTRATO POTASICO Y MORFOLOGIA DE
LOS CRISTALES, EN SOLUCIONES HIDROALCOHOLICAS Y EN VINOS.

4.1 INTRODUCCION	83
4.2 MATERIAL Y METODOS	86
4.2.1 Muestras	86
4.2.2 Medida de la conductividad	86
4.2.3 Control de temperatura	86
4.2.4 Determinación de la concentración de potasio	86
4.2.5 Determinación de la concentración de ión bitartrato	87
4.2.6 Medida del pH	87
4.2.7 Agitación	87
4.2.8 Descripción del dispositivo experimental	87
4.2.9 KHT utilizado para la siembra	88
4.2.10 Difracción de Rayos X	88
4.3 RESULTADOS Y DISCUSION	88
4.3.1 Estudio de la precipitación del KHT en soluciones hidroalcohólicas y en vinos, sin siembra	88
4.3.1.1 Precipitación a partir de soluciones hidroalcohólicas	88
4.3.1.2 Precipitación a partir de vinos	100
4.3.1.3 Cinética de la precipitación	102
4.3.1.4 Estequiometría de la precipitación	107
4.3.2 Cinética de la precipitación del KHT en vinos, con siembra de cristales	112
4.3.2.1 Rendimiento de la precipitación	112
4.3.2.2 Temperatura de saturación y estabilidad del vino despues del tratamiento	116
4.3.2.3 Cinética de la precipitación	121
4.3.2.4 Estequiometría de la precipitación	123
4.3.3 Aspectos morfológicos y estructurales del KHT	125
4.3.3.1 Estructura y morfología de los cristales del KHT	125
4.3.3.2 Formas y mecanismos de crecimiento	129
4.3.3.3 Crecimiento del KHT en vinos	142

4.4 CONCLUSIONES	146
CAPITULO 5.	
COMPOSICION DE LOS VINOS BASE UTILIZADOS EN LA ELABORACION DE CAVAS.	
5.1 INTRODUCCION	148
5.2 ESTUDIO DE LA FRACCION PROTEICA PRESENTE EN MOSTOS Y VINOS	151
5.2.1 Factores de los que depende el contenido en proteínas de los mostos y vinos	152
5.2.2 Aislamiento y cuantificación de la proteína total	155
5.2.3 Caracterización de las proteínas	160
5.2.4 Estabilidad de las proteínas de los mostos y vinos	164
5.3 MATERIALES Y METODOS	166
5.3.1 Muestras	166
5.3.2 Grado alcohólico	166
5.3.3 Acidez total	166
5.3.4 Acidez volátil	166
5.3.5 Extracto seco	167
5.3.6 Cenizas	167
5.3.7 pH	167
5.3.8 Acido tartárico	167
5.3.9 Acido málico	167
5.3.10 Acido láctico	167
5.3.11 Fructosa	167
5.3.12 Glucosa	168
5.3.13 Glicerina	168
5.3.14 Polifenoles totales	168
5.3.15 Intensidad de color	168
5.3.16 Nitrógeno total	168
5.3.17 Prolina	169
5.3.18 Aminoácidos libres	169
5.3.19 Preparación de la muestra para el análisis de la fracción proteica	169
5.3.20 Proteína total	170
5.3.21 Electroforesis sobre Gel de Poliacrilamida sin	

agentes desnaturalizantes	170
5.3.22 Electroforesis sobre Gel de Poliacrilamida con agentes desnaturalizantes	170
5.3.23 Isoelectroenfoque	171
5.4 RESULTADOS Y DISCUSION	172
5.4.1 Características analíticas de los vinos base utilizados en la elaboración de cavas	172
5.4.2 Estudio de la fracción proteica de mostos y vinos base utilizados en la elaboración de cavas	186
5.5 CONCLUSIONES	191

CAPITULO 6

COMPOSICION DE TARTRATOS PROCEDENTES DE DEPOSITOS DE FERMENTACION, ALMACENAMIENTO Y ESTABILIZACION DE VINOS BASE PARA LA ELABORACION DE CAVAS.

6.1 INTRODUCCION	194
6.2 MATERIALES Y METODOS	197
6.2.1 Muestras	197
6.2.2 Difracción de Rayos X	197
6.2.2.1 Equipo instrumental	197
6.2.2.2 Curva de calibrado	197
6.2.3 Preparación de la muestra	199
6.2.3.1 Fluorescencia de Rayos X	199
6.2.3.2 Análisis químicos	199
6.2.3.3 Análisis de proteínas	199
6.2.3.4 Análisis de compuestos fenólicos	199
6.2.4 Determinación de sodio, hierro, magnesio, calcio y potasio por fluorescencia de Rayos X	200
6.2.4.1 Equipo instrumental	200
6.2.4.2 Determinación de las pérdidas por calcinación	200
6.2.4.3 Condiciones experimentales	200
6.2.4.4 Curva de calibrado	200
6.2.5 Determinación de cobre	200
6.2.5.1 Equipo instrumental	200
6.2.5.2 Curva de calibrado	202

6.2.6 Determinación de Carbono e Hidrógeno	202
6.2.7 Nitrógeno total	202
6.2.8 Acido tartárico	202
6.2.9 Acido málico	202
6.2.10 Acido oxálico	202
6.2.11 Azúcares reductores libres	203
6.2.12 Azúcares reductores totales	203
6.2.13 Proteínas	203
6.2.14 Polifenoles totales	203
6.2.15 Polifenoles poco polimerizados	203
6.2.16 Leucoantocianos	203
6.2.17 Catequinas	203
6.2.18 Acidos fenólicos y sus ésteres por cromatografía de líquidos de alta eficacia	203
6.2.18.1 Equipo instrumental	203
6.2.18.2 Preparación de la muestra	204
6.3. RESULTADOS Y DISCUSION	204
6.4. CONCLUSIONES	223

CAPITULO 7.

ESTUDIO DE LOS INHIBIDORES DE LA CRISTALIZACION DEL KHT MEDIANTE TECNICAS DE CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR Y ELECTROFORESIS.

7.1 INTRODUCCION	224
7.2 MATERIALES Y METODOS	225
7.2.1 Muestras	225
7.2.2 Preparación de la muestra	225
7.2.2.1 Preparación de la muestra para cromatografía de exclusión molecular	225
7.2.2.2 Preparación de la muestra para el análisis electroforético	226
7.2.3 Fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular	226
7.2.4 Determinación de polifenoles totales	226
7.2.5 Determinación de nitrógeno amínico	226
7.2.6 Determinación de proteína	229
7.2.7 Hidrólisis de proteínas	229

-VIII-

7.2.8 Detección de nucleótidos	229
7.2.9 Detección de pectinas	229
7.2.10 Electroforesis sobre gel de poliacrilamida con y sin agentes desnaturalizantes	229
7.2.11 Isoelectroenfoque	229
7.3 RESULTADOS Y DISCUSION	230
7.3.1 Tartratos procedentes de depósitos de fermentación de mostos	230
7.3.2 Tartratos procedentes de depósitos de estabilización por frío	238
7.3.3 Estudio electroforético de la fracción proteica presente en los tartratos	247
7.4 CONCLUSIONES	251
CONCLUSIONES GENERALES	255
BIBLIOGRAFIA	260

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

ASTM American Society of Testing Materials
ADP Adenosin difosfato
ATP Adenosin trifosfato
ATP-asa Adenosin trifosfatasa
B.O.E. Boletín Oficial del Estado
BSA Seroalbumina bovina
C.E. Comunidad Europea
CaI Tartrato cálcico
GK Glicerokinasa
HK Hexosaquinasa
IEF Isoelectrenfoque
KET Bitartrato potásico
LDH Lactato deshidrogenasa
L-LDH Lactato deshidrogenasa
L-MDH Malato deshidrogenasa
NAD Nicotinamida adenindinucleótido
NADH Forma reducida del NAD
NADP Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
NADPH Forma reducida del NADP
OPA-derivados Ortocetaldehido-derivados
PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAGE-SDS Electroforesis en gel de poliacrilamida con agentes
 desnaturalizantes
PEP Fosfoenolpiruvato
PGI Fosfoglucoisomerasa
PK Piruvatoquinasa

-X-

SXS Dodecilsulfato sódico

T Porcentaje de acrilamida en el gel

C Relacion (%) Gramos de bisacrilamida/T

INTRODUCCION GENERAL

Se denominan "vinos espumosos naturales" (B.O.E., 1972) los procedentes de variedades adecuadas, que contienen, como consecuencia de su especial elaboración, gas carbónico de origen endógeno y que al ser descorchada la botella y escanciado el vino forma espuma de sensible persistencia, seguida de un desprendimiento continuo de burbujas. El gas carbónico habrá de proceder de una segunda fermentación, realizada en envase herméticamente cerrado, de azúcares naturales del vino base o azúcares agregados, y el producto terminado deberá tener una presión mínima de cuatro atmósferas, medida a 20°C.

La elaboración de vinos espumosos se realiza en todos los países vitivinícolas del mundo, siendo dentro de los distintos tipos de vino espumoso, el de características sensoriales más apreciadas el elaborado según el "método champenoise", originario de la región de Champagne.

La protección de las denominaciones de origen ha conducido a la C.E. a prohibir el empleo de la expresión *champagne* o *método champenoise* en las botellas elaboradas fuera de la región de Champagne, dando de plazo hasta 1992 para que los elaboradores de otras regiones adapten la comercialización de sus productos.

Esto ha llevado a la búsqueda de otros vocablos para comercializar este tipo de vinos. En España se ha elegido el término "cava" para designar (B.O.E., 1972): "el vino espumoso natural, cuyo

proceso de elaboración y crianza, desde la segunda fermentación hasta la eliminación de lías inclusive, transcurre en la misma botella en que se ha efectuado el tiraje". Se denomina "tiraje" (B.O.E., 1972) a la operación que consiste en el llenado de la botella con vino base, adicionando la levadura y la sacarosa necesarias para que se produzca la segunda fermentación.

España ocupa el sexto lugar del mundo en cuanto al volumen de producción de vinos espumosos (Tabla I), pero es el segundo país productor de espumosos por el método champenoise.

Tabla I. Producción mundial de vinos espumosos en 1986 (miles de botellas de 75 cl.).

	Método Champenoise	Otros	Total
Francia *	166.000	172.000	338.000
Francia **	-	-	341.000
Alemania **	4.000	276.000	280.000
URSS **	-	230.000	230.000
Italia **	16.000	160.000	176.000
Estados Unidos **	21.000	135.000	156.000
España **	115.347	11.000	126.347

* datos de 1983 según Bidan y col. 1986.

** Consejo Regulador de los Vinos Espumosos de España.

La producción española de vinos de "cava", está en continúa progresión (Tabla II) con un total, de 138.940 miles de botellas, en 1988, lo que representa el 92 % de la producción nacional de vinos espumosos, la más alta entre todos los países del mundo. El aumento más significativo de la producción tiene lugar en las partidas destinadas a la exportación. El 98,4 % de la producción española se centraliza en S. Sadurní de Noya (Bori, 1986) dentro de la comarca vitivinícola del Penedés y se elabora con uvas de tres variedades blancas: Parellada, Macabeo y Xarello.

La producción de cavas a partir de estas variedades conduce a vinos de características sensoriales peculiares y muy apreciadas. (Rosa, 1987)

Tabla II. Evolución de la producción española de cava * (en miles de botellas de 75 cl.).

Año	Mercado interior	Exportación	Total
1974	53.458	3.542	57.000
1980	72.000	10.048	82.048
1985	82.650	28.852	111.502
1988	91.670	47.270	138.940

* Consejo Regulador de los Vinos Espumosos de España.

Justificación del tema.

En la producción de vinos "cava" se vigilan cuidadosamente todas las etapas de la elaboración, desde el estado sanitario de la uva hasta la salida del producto al mercado. La necesidad de presentar un producto atractivo al consumidor, es decir, limpio, brillante y sin sedimentos y la comercialización en la misma botella en que ha tenido lugar la segunda fermentación, hace que los riesgos de turbidez sean especialmente temidos por el elaborador.

Una práctica habitual en las bodegas en las que se elaboran vinos de "cava" es el tratamiento por frío para conseguir la eliminación del bitartrato potásico. El sistema más utilizado, en España, es la estabilización tradicional, que obliga a mantener al vino en depósitos isotermos durante siete u ocho días. La aparición de nuevas técnicas pretenden conseguir la mejor estabilización al mejor precio y la reducción de la duración de esta práctica parece un objetivo prioritario.

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de la fisicoquímica de las soluciones tartáricas, todavía hay mucho empirismo en las operaciones que se realizan en bodega para provocar la precipitación del KHT y se desconoce el mecanismo por el que el resto de los componentes del vino interfieren en la misma. Por ello se ha planteado este estudio que incluye la fisicoquímica de las soluciones tartáricas, el estudio de la cristalización del KHT en el estudio de la cristalización del KHT en soluciones hidroalcohólicas y

vinos, el estudio de la composición de los vinos destinados a la elaboración de cavas y la identificación de los inhibidores de la cristalización del KHT en el vino.

Plan de trabajo.

En el capítulo primero se hace una revisión del origen y de la importancia del potasio y del ácido tartárico en la uva, en el mosto y en el vino, así como de las repercusiones que tiene la presencia simultánea de ambos compuestos. Se repasan también los métodos de que dispone el elaborador para conseguir la estabilidad tartárica del vino.

En el capítulo segundo se revisan los conocimientos actuales sobre los mecanismos de precipitación (nucleación y crecimiento cristalino) que consideramos necesarios para abordar el problema y que, en ocasiones, son motivo de confusión entre los enólogos.

En el capítulo tercero, se considera la físicoquímica de las soluciones tartáricas y, por extensión, del vino. Se han incluido todas las Tablas necesarias para el cálculo de la sobresaturación en KHT del vino, para que el lector no tenga que recurrir a los trabajos originales para su consulta. La parte experimental de este capítulo comprende la medida de la conductividad específica de soluciones y vinos y el estudio de su utilidad para conocer la concentración en potasio de las mismas.

En el capítulo cuarto se ha estudiado la precipitación del KHT a través de los mecanismos de nucleación homogénea y secundaria, la influencia de los parámetros experimentales más significativos en la nucleación homogénea (la sobresaturación y la agitación) y en la nucleación secundaria (la temperatura, la agitación y la cantidad de siembra), y termina con un estudio morfológico comparado de los cristales de KHT obtenidos en soluciones hidroalcohólicas y en vinos.

En el capítulo quinto se estudia la composición de los vinos base destinados a la elaboración de cava. Se ha dedicado un interés especial al estudio de la fracción proteica de los mismos, tanto por su participación en la precipitación del KHT como por la ausencia de antecedentes sobre estos importantes compuestos en las variedades de uva españolas.

El capítulo sexto se dedica al estudio de la composición de los cristales que aparecen en los depósitos de fermentación, almacenamiento y estabilización por frío de los vinos con el fin de conocer cuales son los compuestos que se adsorben en las caras de los cristales de KHT inhibiendo o retardando su desarrollo.

Y por último, en el capítulo séptimo se presta especial atención al estudio de los compuestos de alto peso molecular que precipitan simultáneamente con el KHT y a los que se responsabiliza de una parte importante de la inhibición de la cristalización.

CAPITULO 1

EL ACIDO TARTARICO Y EL POTASIO EN EL VINO. REVISION DE LOS METODOS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA PARA LA ESTABILIZACION TARTARICA DE LOS VINOS.

RESUMEN.

Al ser el vino una solución saturada de bitartrato potásico (KBT) existe la posibilidad de la aparición de turbidez en los vinos embotellados. La necesidad de presentar un producto atractivo para el consumidor, hace que las operaciones encaminadas a procurar la estabilización frente a las precipitaciones tartáricas formen parte de la elaboración de los vinos de calidad. En este capítulo, se hace una revisión sobre el origen y la importancia del ácido tartárico y el potasio en el vino y sobre los métodos que la industria utiliza para la estabilización tartárica de los vinos.

1.1 EL ACIDO TARTARICO Y EL POTASIO EN EL VINO.

Podemos definir al vino como una solución hidroalcohólica de ácidos orgánicos salificados en proporción variable fundamentalmente por K^+ y Ca^{2+} . Estos constituyentes pueden encontrarse en el vino, en solución verdadera o como suspensión coloidal. Sus proporciones relativas pueden variar de unos vinos a otros, en función de diversos factores tales como la variedad de uva de la que proceden, la localización geográfica del viñedo, la forma de llevar a cabo la vendimia y la elaboración, etc.. (Riberau-Gayon y col. 1982, Troost, 1985).

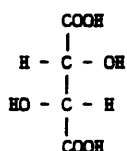
La cantidad de ácidos presentes en el vino se determina analíticamente por neutralización con sosa diluida de un volumen fijo de vino y se expresa en gr/l de ácido tartárico, de ácido sulfúrico o en miliequivalentes de ácido. Este dato no proporciona información real acerca de la acidez del medio (Plana y col. 1980; Riberau-Gayon y col., 1982), que dependerá del estado de disociación de los distintos ácidos, por lo que debe completarse con el del pH (Amerine y Ough, 1976). Tanto la composición ácida del vino como el pH son de fundamental importancia no sólo en la percepción de la acidez y, por tanto, de sus propiedades organolépticas, sino también para la estabilidad microbiológica del vino, la incidencia y extensión de la fermentación maloláctica, la solubilidad de las sales tartáricas, la proporción de SO_2 , libre y combinado, la velocidad de formación e hidrólisis de los ésteres, el estado de ionización y la velocidad de polimerización de los pigmentos antocianícos de los vinos tintos y la incidencia de las quiebras proteicas en los vinos blancos (Amerine y Ough, 1976; Usseglio-Tomasset, 1977; Paroneto, 1978 a, b y c; Riberau-Gayon, 1982; Troost, 1985).

La presencia conjunta de los ácidos orgánicos y sus sales constituye un sistema tampón capaz de regular pequeñas variaciones de pH que tiene extraordinaria importancia para la regulación de las lentas reacciones que se producen en la evolución del vino hacia su envejecimiento (Wejnar, 1971).

Entre los ácidos orgánicos ocupa un lugar destacado el ácido tartárico, por ser el ácido mayoritario (Polo y col., 1986). En vinos procedentes de latitudes muy frías e incompleta maduración, el ácido mayoritario puede ser el ácido málico (Wejnar, 1971); de los cationes

el más abundante, con gran diferencia sobre los demás, es el potasio (Riberau-Gayon y col. 1975), de donde se desprende la importancia de los sistemas químicos en que participan el potasio y el ácido tartárico.

El ácido tartárico presente en la uva es el isómero dextrógiro de configuración *levo*, L(+)-tartárico:



siendo la vid la única planta europea que presenta concentraciones de ácido tartárico suficientes como para justificar su extracción industrial.

Durante el período vegetativo de la vid, el contenido en ácido tartárico se mantiene constante en los distintos órganos de la planta. Al terminar este período, comienza la acumulación de ácido tartárico en todos los órganos en crecimiento, fundamentalmente en las hojas y en los racimos (Riberau-Gayon y Peynaud, 1971), deteniéndose casi por completo al llegar al envero.

El ácido tartárico se almacena en las distintas partes de la planta en forma de cristales de sus sales. Debido a la abundancia de potasio, se pensó que los precipitados cristalinos eran de KHT (Usseglio-Tomasset, 1978). Sin embargo, recientes estudios realizados usando microscopía electrónica, han revelado que la mayoría de los cristales son de tartrato cálcico tetrahidratado (Rufner, 1982; Storey, 1987). El consumo metabólico de ácido tartárico debe ser repuesto a expensas de estos cristales, lo que indica que el

de estos cristales con el medio no es sencillo ya que el pH que suministraría iones tartrato, no es el pH fisiológico.

La biosíntesis del ácido tartárico ha sido estudiada utilizando $^{14}\text{CO}_2$ bajo diferentes condiciones de asimilación. El ácido tartárico, al contrario que el ácido málico, no incorpora $^{14}\text{CO}_2$ en la oscuridad pero sí en condiciones de fotosíntesis, aunque de forma muy lenta. Las rutas metabólicas propuestas para la biosíntesis del ácido tartárico son (Rufner, 1982) principalmente dos: Biosíntesis a partir de la glucosa, con el ácido ascórbico como producto intermediario y transformación de compuestos aldurónicos, seguramente del ácido galacturónico.

La maduración de la uva va acompañada de una pérdida notable de acidez y una rápida acumulación de azúcares. El ácido tartárico junto con el málico se consumen a través de los mecanismos de respiración celular. La proporción de ácidos degradada es función de la temperatura y al parecer, por encima de los 30º, se consume casi exclusivamente el tartárico (Riberau-Gayon y Peynaud, 1971).

El ácido tartárico, junto con el ácido málico, representa el 90% de la acidez propia de la uva. Es el de mayor carácter ácido (menor pH), de los ácidos presentes en la uva (Tabla 1.1) y el más abundante (Kliewer y col., 1967 y Polo y col., 1986), por lo que tiene una gran influencia en el pH final del mosto y del vino. Puede encontrarse en el vino en forma de complejos con metales pesados tales como el hierro y el cobre (Riberau-Gayon y col., 1976), o en forma de ésteres (Ong y Nagel, 1978), relacionándose la formación de éstos con el envejecimiento del vino.

Tabla 1.1. Valor del pK de las constantes de disociación termodinámicas (pK_r) de los principales ácidos orgánicos presentes en el vino, en función del grado alcohólico (A), según Usseglio-Tomasset y Bosia (1978).

Acido Tartárico	pK ₁ τ = 3,075126 + 0,010974 A + 0,000164 A ²
	pK ₂ τ = 4,386888 + 0,014713 A + 0,000161 A ²
Acido Máfico	pK ₁ τ = 3,473524 + 0,011868 A + 0,000153 A ²
	pK ₂ τ = 5,099294 + 0,017008 A + 0,000109 A ²
Acido Láctico	pK τ = 3,888923 + 0,012077 A + 0,000150 A ²
Acido Cítrico	pK ₁ τ = 3,15249 + 0,011673 A + 0,000176 A ²
	pK ₂ τ = 4,724273 + 0,016779 A + 0,000004 A ²
Acido Acético	pK τ = 4,755063 + 0,007958 A + 0,000288 A ²
Acido Succínico	pK ₁ τ = 4,205371 + 0,012377 A + 0,000176 A ²

Parte del ácido tartárico presente en el mosto y en el vino puede ser de procedencia exógena ya que en el actual reglamento de la Ley 25/1970 "Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes" (B.O.E., 1972 b) se permite la adición de este ácido; sin embargo, los equilibrios en los que participa, y entre ellos la precipitación de KHT, hace que sea menos eficaz como corrector de la acidez que otros ácidos permitidos, como por ejemplo el ácido cítrico.

El potasio es el elemento más abundante en la uva. Su acción se manifiesta en muchos de aspectos aunque los mecanismos de actuación no son conocidos con certeza. Procede, fundamentalmente, de la absorción

a través de las raíces de los constituyentes del suelo, aunque también puede ser absorbido por las partes aéreas de la planta. Los mecanismos de distribución hacia los distintos órganos de la planta, no están claros. Se barajan distintas hipótesis en las que se involucran fenómenos de difusión, diferencia de potencial, o bien mecanismos de transporte con participación de proteínas.

Se sabe que es un elemento muy móvil presente, en su forma catiónica, K^+ , fundamentalmente en el citoplasma y en las vacuolas. Participa en los fenómenos de regulación osmótica y por tanto en el contenido en agua del vegetal. Reduce la transpiración, juega un importante papel en la condensación de los aminoácidos para dar péptidos y proteínas, y en el transporte de glúcidos entre distintas partes de la planta (Riberau Gayon y Peynaud, 1971), por lo que es indispensable en plantas ricas en azúcares como es el caso de la vid.

El potasio se encuentra en la planta salificando ácidos orgánicos entre ellos el ácido tartárico en forma de KHT que se va acumulando en las bayas durante la maduración (Usseglio-Tomasset, 1978). Sólo una parte del mismo puede ser sustituido por otros cationes alcalinos como el sodio o el litio.

El contenido en potasio de las uvas puede modificarse con el abono de la planta. Morris y col. (1980), indican que un abono de la vid rico en potasio, ocasiona un aumento en el contenido en potasio y del pH del mosto y una caída de la cantidad de calcio, manganeso y magnesio, este último a niveles de deficiencia. Un alto contenido de potasio, parece rebajar la calidad del mosto, sobre todo en lo que respecta a los aspectos relativos a la estabilidad del color (Morris y col. 1983). La forma de llevar a cabo la elaboración con maceración o

no de los hollejos, la duración de esta maceración, así como el tamaño de las uvas, por la relación superficie-volumen, también va a influir en el contenido final en potasio ya que el hollejo cede iones potasio contribuyendo a salificar los ácidos orgánicos presentes.

El potasio por su influencia sobre el pH del producto, juega también un papel importante en la calidad sensorial y en la conservación del vino. El pH del mosto y del vino, depende de la cantidad de ácidos y de la de cationes presentes que puedan salificarlos y entre éstos el más abundante es, sin duda, el potasio. Un pH elevado suele asociarse con un elevado contenido en potasio.

El potasio presente en el vino, como el ácido tartárico, también puede ser de procedencia exógena. La Legislación (B.O.E., 1972 b) permite el uso de sales potásicas con distintos objetivos: conservantes (bisulfito potásico), desacidificantes (carbonato potásico), etc..

Sin duda alguna, la presencia conjunta del ácido tartárico y del potasio en la uva va a quedar reflejada en el pH, la acidez y el poder tamponador del mosto y del vino. Todo ello le proporciona estabilidad al vino.

Se han realizado numerosos estudios encaminados a interrelacionar variables en las que intervienen estos dos componentes en el vino: alcalinidad de las cenizas, acidez total, acidez valorable, pH, contenido en potasio y ácido tartárico (Wejnar, 1971, Sommers, 1975; Boulton, 1980 a, b y c, Delfini, 1987).

Wejnar (1971), encuentra una estrecha correlación entre el pH del vino y el contenido en ácido tartárico y potasio, así como con la alcalinidad de las cenizas y, en cambio, no con el contenido en

ácido málico. La correlación es aún más estrecha entre el pH y el cociente entre la acidez total y alcalinidad de las cenizas y es prácticamente nula entre el pH y el cociente entre el contenido en ácido málico y la alcalinidad de las cenizas.

La relación encontrada por Vejner (1971) entre la concentración de potasio, $[K^+]$, y la concentración de protones $[H^+]$:

$$[K^+] = A + B[H^+]$$

donde A y B son constantes, es diferente de la encontrada después por Sommers (1975):

$$[K^+] = (A' + B')/[H^+]$$

al estudiar distintos tipos de vinos. Esto hizo suponer a Boulton (1980 a) que los casos descritos eran casos particulares de una ley de aplicación más general. Así, encontró una buena correlación entre el pH y la suma de la acidez valorable más el contenido en potasio y sodio. Esto le condujo más tarde a postular (Boulton, 1980 c) la presencia de una enzima, la ATP-asa, responsable del intercambio entre protones y cationes monovalentes: potasio y, en menor medida, sodio.

1.2 ESTABILIZACIÓN DE LOS VINOS FRENTE A LAS PRECIPITACIONES TARTÁRICAS.

El ácido tartárico se disocia generando iones tartrato y bitartrato lo que puede originar la precipitación de sus sales: bitartrato potásico (KHT) y tartrato cálcico (CaT), por desplazamiento hacia la derecha de los siguientes equilibrios:



Este fenómeno que ocurre espontáneamente durante la elaboración y posterior almacenamiento de los vinos es interpretado, a veces, como una desacidificación natural, deseable desde el punto de vista sensorial. Sin embargo, cuando sobreviene después del embotellado da lugar a un producto turbio que es rechazado por el consumidor. Por esta razón, la estabilización de los vinos es imprescindible para garantizar la buena acogida del producto.

La variación de la solubilidad de estas sales, con el grado alcohólico y la temperatura, es distinta. La precipitación del tartrato de calcio ocurre muy lentamente, siendo la solubilidad de esta sal menos sensible a la variación de la temperatura y a la cantidad de alcohol (Figura 1.1) que la del KHT (Figura 1.2). Los cristales de CaT son blanquecinos, granulares, de aspecto pulverulento, insolubles en agua caliente y pueden ser confundidos, a primera vista, con un enturbiamiento microbiológico. La aparición de precipitados de esta sal no es tan corriente como las originadas por el KHT que veremos mas adelante. Un riguroso control de los depósitos de elaboración y almacenamiento de los vinos así como de los productos enológicos empleados durante las distintas fases de la elaboración,

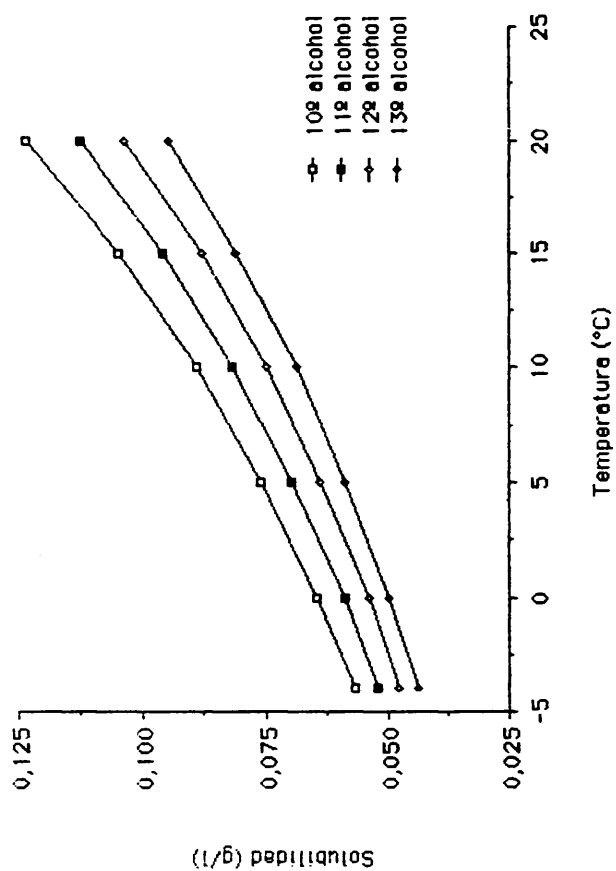


Figura 1.1. Solubilidad (g/l) del tartrato cálcico tetrahidratado ($\text{CaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en función de la temperatura y el grado alcohólico, según Berg y Keefer (1959).

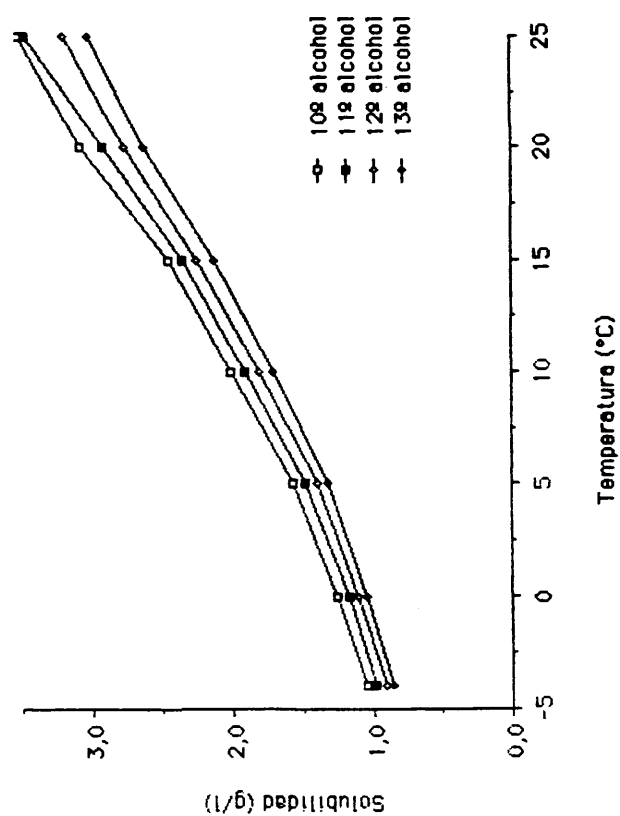


Figura 1.2. Solubilidad (g/l) del bitartrato potásico ($\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$) en función de la temperatura y el grado alcohólico, según Berg y Keefer (1956).

para eliminar la posibilidad de intercambio de iones calcio, es, en la mayoría de los casos, suficiente para eliminar el riesgo de precipitación.

La precipitación del KHT es un fenómeno mucho más extendido que la del tartrato cálcico, siendo el principal responsable de la turbidez de los vinos embotellados. El precipitado de KHT tiene aspecto cristalino en forma de placas o agregados mas o menos grandes. Vistos al microscopio, los cristales presentan formas romboidales (Rodríguez y Correa, 1988), siendo fácilmente solubles en agua caliente.

El vino joven está sobresaturado en KHT. Esta sobresaturación va disminuyendo lentamente a lo largo del proceso de envejecimiento del vino, pudiendo tardar hasta dos años en alcanzar niveles de saturación (Riberau-Gayon y col., 1977).

La probabilidad de la aparición de turbidez ocasionada por las sales tartáricas, puede variar según el tipo de vino, debido a sus diferentes condiciones de consumo. Así, los vinos sometidos a crianza en bodega, para los que se suele recomendar una temperatura de consumo de unos 15°C, son los menos afectados. Por el contrario, los vinos jóvenes y afrutados, cada vez más reclamados por el consumidor, que son embotellados a las pocas semanas de haber terminado la fermentación y consumidos a temperaturas no superiores a 8°C, presentan un elevado riesgo de turbidez. En el mismo caso, se encuentran los vinos de "cava", que experimentan la segunda fermentación en la misma botella en la que saldrán al mercado. Las condiciones óptimas de consumo para estos vinos, de 4 a 6°C, no hacen

más que aumentar la necesidad de actuar sobre la formación de estos cristales.

La presencia de un precipitado en la botella, puede tener, sobre el consumidor mal informado, respuestas tan dispares como achacar la existencia del mismo a la procedencia artesanal del producto o, a calificarlo de fraudulento. Desde el punto de vista técnico, la presencia de un precipitado, independientemente de su naturaleza, es inaceptable, hasta el punto de que, en la actualidad, un vino turbio o con depósito de cristales es descalificado. Todo esto, hace que las prácticas encaminadas a eliminar el riesgo de precipitación en la botella se vayan imponiendo cada vez más en los vinos de calidad.

La forma de llevarse a cabo la precipitación de estas sales en los vinos, es muy distinta de cómo tiene lugar en las soluciones hidroalcohólicas a los mismos niveles de sobresaturación. El estudio de este fenómeno, ha ocupado numerosas publicaciones (Berg y Keefer, 1958 y 1959; Cantarelli, 1964; Pilone y Berg, 1965; Balakian y Berg, 1968; Usseglio Tomasset y Bosia, 1982; Maujean y col., 1984, 1985 y 1986; Rodríguez y Correa, 1988), sin haber llegado a explicarlo definitivamente. El problema del mantenimiento de la sobresaturación durante largos periodos de tiempo, parece apuntar en dos sentidos. Por un lado, existe la posibilidad de que los iones implicados en la precipitación formen complejos con otras sustancias presentes de forma natural en el vino, lo que reduciría la concentración efectiva de los mismos y con ello la sobresaturación inductora de la precipitación. Por otro, sustancias de naturaleza coloidal tales como las proteínas, los polifenoles y los taninos, las pectinas y los polisacáridos, pueden actuar sobre los núcleos nacientes de estas sales impidiendo su

desarrollo y, permitiendo, con ello su decantación o separación por filtración.

En cualquier caso no se ha conseguido una descripción clara del fenómeno ni, por supuesto, una solución definitiva del mismo, aunque se han obtenido avances técnicos importantes para activar la precipitación y se han desarrollado diversas técnicas para evitar la aparición de cristales en los vinos embotellados.

Estas técnicas pueden clasificarse atendiendo a su mecanismo de actuación como sigue:

Técnicas de estabilización que manteniendo la sobresaturación evitan la aparición de cristales.

Técnicas de estabilización que evitan la precipitación al eliminar alguno de los iones precipitantes.

Técnicas de estabilización que eliminan la sobresaturación provocando la precipitación.

1.2.1 Técnicas de estabilización que manteniendo la sobresaturación evitan la aparición de cristales.

Estas técnicas se basan en la adición al vino de sustancias de carácter coloidal que impiden el desarrollo de los cristales. La adición de las mismas debe mantener, como es lógico, las cualidades sensoriales de los vinos tratados y cumplir con la legislación vigente para preservar la salud del consumidor. De entre estas sustancias se destacan dos: el hexametáfosfato sódico y el ácido metatartárico.

El interés del hexametáfosfato sódico es puramente histórico. Fue la primera evidencia experimental de que un fenómeno de inhibición podía utilizarse para evitar la formación de cristales tartáricos en

vinos. Su uso ha sido descartado ya que arrastra, entre otros, los siguientes inconvenientes:

- a) necesita grandes dosis para ser eficaz (del orden de 250 gr/Hl).
- b) aumenta el contenido en fosfato y las cenizas del vino.
- c) entraña el peligro de aparición de turbidez por interacción de los iones fosfato con el catión férrico (quiebras férricas).

Estos motivos han contribuido a que esta práctica no esté permitida en la actualidad ni por la Legislación española (B.O.E., 1972 b) ni por la de ningún país de la C.E. ni por la Oficina Internacional de la Vid y el Vino (O.I.V.).

El ácido metatartárico (Peynaud 1964; Riberau-Gayon y col., 1977; Paronetto 1978 a, b y c) es una sustancia de composición no muy bien definida químicamente. Se obtiene por calentamiento del ácido D-tartárico hasta unos 170°C. Fue Scazzola (1956) el primero en dilucidar su estructura (Figura 1.3) resultando ser un poliéster de peso molecular no definido y de índice de esterificación variable entre el 30 y el 40 %.

La adición de esta sustancia es una práctica permitida en la Legislación española (B.O.E., 1972 b), en dosis no superior a 100 miligramos por litro, así como en el resto de los países de la C.E. y en casi todos los países vitivinícolas del mundo.

El Estatuto de la Vid, del Vino y de los Alcoholes (B.O.E., 1972 b) describe al ácido metatartárico como sigue: "Se presenta cristalizado o en polvo, blanco o amarillento, siendo muy deliquescente y muy soluble en agua y alcohol. El producto enológico

debe contener, como mínimo, el 105 por 100 de ácido tartárico y el 32 por 100 de ácido esterificado."

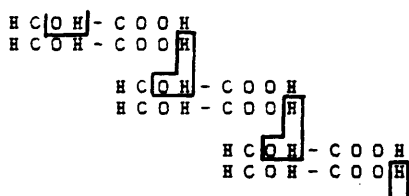


Figura 1.3. Estructura del ácido metatartárico según Scazzola (1956) .

El uso del ácido metatartárico no se puede considerar, en ningún caso, una solución definitiva al problema ya que únicamente impide el enturbiamiento de los vinos durante un tiempo limitado, en función de su índice de esterificación y de la cantidad añadida junto con la temperatura de almacenamiento, grado de sobresaturación y pH del vino. Transcurrido el tiempo límite, aumenta la cantidad de ácido tartárico del vino y, con ello, el producto de concentraciones del KHT en el vino, agravando el problema.

Las precauciones que se deben tomar para que el ácido metatartárico tenga efectividad, según los distribuidores de este producto enológico, son:

- Reducir, en lo posible el contenido en sustancias nitrogenadas. Para ello se recomienda el uso de clarificantes del tipo de la bentonita o la gelatina.
- Evitar las cantidades excesivas de hierro. Para ello se debe de evitar al máximo el contacto del vino con elementos férricos.
- Incorporarlo al vino antes del último filtrado y después de todos los tratamientos habituales en la bodega.

La dosis recomendada está en torno a los 10 gr/Hl que es la máxima permitida.

En la misma línea de actuación de estas sustancias, retardar la formación de núcleos de dimensiones capaces de producir enturbiamiento, podemos citar, aunque su fundamento sea distinto, la pasteurización y el embotellado en caliente de los vinos. El aumento de la temperatura, reduce la sobresaturación en KHT y lleva consigo la disolución de los posibles núcleos formados, retardando así la aparición de otros capaces de provocar turbidez. El efecto de estas prácticas es el mismo que el del uso de agentes inhibidores aunque por distintos motivos. Con la utilización de inhibidores se detiene el crecimiento de los cristales antes de que alcancen dimensiones críticas y con el calor disminuye el tamaño de los mismos. En ambos casos, al cabo del tiempo puede volver a aparecer el problema.

Estos procedimientos, si bien constituyen un recurso técnico para evitar la aparición de turbideces en el vino embotellado, han quedado restringidos para vinos de mesa corrientes, cuyo consumo es rápido una vez que salen al mercado.

1.2.2 Técnicas de estabilización que evitan la precipitación al eliminar alguno de los iones precipitantes.

1.2.2.1 Resinas de intercambio iónico.

Una forma de prevenir las precipitaciones de KHT en los vinos, consiste en la sustitución del catión potasio por el catión sodio en la proporción necesaria para reducir el producto de concentraciones hasta el valor del producto de solubilidad a la supuesta temperatura de consumo o almacenamiento. Esto se consigue empleando resinas de

intercambio iónico, pero su uso no está autorizado por la O.I.V., y está prohibido en la C.E., que se ha pronunciado en contra de cualquier tratamiento no imprescindible que aumente el contenido en sodio del vino, por los fenómenos de hipertensión que este catión puede originar.

El Estatuto de la Vidia, del Vino y de los Alcoholes (B.O.E., 1972 b) prohíbe: "Todo tratamiento no autorizado expresamente que suponga cambio en la composición iónica del vino", y el tratamiento con resinas no está autorizado.

1.2.2.2 Electrodialisis.

La prevención de las precipitaciones tartáricas se puede realizar también mediante la utilización de la electrodialisis. Con esta técnica se consigue reducir la concentración de los iones precipitantes: catión potasio y anión bitartrato. El punto crítico de esta técnica, está en la disponibilidad de membranas selectivas para eliminar específicamente estos iones. Como en el vino están presentes otros iones parecidos, en cuanto a tamaño y carga a los citados, este propósito no es fácil y se eliminan, simultáneamente, otros iones, lo que produce pequeñas variaciones en algunos valores analíticos de los vinos tratados.

Los datos analíticos que permanecen constantes son según Vucherpfenning (1978): densidad, grado alcohólico, azúcares y acidez volátil. Experimentan una ligera variación el extracto seco total, el extracto seco no reductor, el ácido málico, el ácido láctico, el sodio y el calcio. La variación es importante en: ácido tartárico, potasio, cenizas y su alcalinidad, anhídrido sulfuroso e iones fosfato.

Con la electrodialisis, la disminucion del potasio y el ácido tartárico no es estequiométrica, eliminándose mayor cantidad de potasio que de ácido tartárico.

Los parámetros de funcionamiento que deben optimizarse para hacer un uso apropiado de la instalación de electrodialisis son: La diferencia de potencial, cuyo valor máximo está directamente relacionado con el límite de polarización de la membrana utilizada; La temperatura de trabajo ya que al bajar la temperatura aumenta la viscosidad del vino, y disminuye mucho la velocidad de migración de los iones, y la velocidad de circulación del vino.

Las distintas constantes de velocidad de migración de los diferentes iones, pueden explicar la mayor disminución de los iones más pequeños (potasio) frente a los más grandes (bitartrato), manteniéndose la electroneutralidad del vino debido a la eliminación simultánea de otros aniones (sulfato y fosfato).

Entre las ventajas de este tratamiento sobre otros, podemos citar que: no es necesaria la inmovilización del vino; no necesita refrigeración y disminuye el contenido en anhídrido sulfuroso, tanto libre como combinado. El gasto energético de este tratamiento es bajo.

Entre sus inconvenientes destacan los de orden técnico (instalación del equipo, vida media de las membranas), y económico (se necesita una gran inversión inicial para su puesta en marcha). Además, la permeabilidad de las membranas no es lo suficientemente selectiva como para impedir la separación, junto al ión potasio y bitartrato de otros iones que forman parte íntima de la compleja estructura del vino. La eficacia de la electrodialisis, parece ser (Troost, 1985) aceptable para vinos blancos y dudosa para tintos y rosados.

1.2.2.3 Osmosis inversa.

La ósmosis inversa, que se conoce también con el nombre de hiperfiltración, consiste en hacer pasar el líquido a tratar, a través de una membrana semipermeable, normalmente de acetato de celulosa, que permite el paso del disolvente (agua y alcohol en el caso del vino), y es capaz de retener las sales minerales sin alterar el contenido en sustancias coloidales. El tamaño de poro de estas membranas es muy fino, del orden de $0.001\mu\text{m}$, inferior incluso al utilizado en las técnicas de ultrafiltración.

Básicamente, se puede considerar la ósmosis inversa como una filtración a presión a través de una membrana que permite el paso del disolvente e impide el del producto disuelto. Esto se traduce en un enriquecimiento del concentrado en sales minerales, lo que facilita la precipitación de las sales insolubles. Después de la filtración se le añade al filtrado el disolvente extraído, regenerando el producto de partida.

El dispositivo utilizado para efectuar la ósmosis inversa, lleva las membranas montadas en un módulo de bastidor de placas o bien en forma de módulo tubular.

Para obtener un buen rendimiento con esta técnica de estabilización frente a las precipitaciones tartáricas, se han de tener en cuenta las siguientes precauciones: los vinos han de clarificarse antes del tratamiento, ya que, como se ha indicado anteriormente, la presencia de sustancias coloidales dificulta la aparición de cristales. La concentración del vino debe ser de al menos un 40% (Troost, 1985), para que el tratamiento sea eficaz; el uso del

frío durante el almacenamiento del concentrado, puede reducir considerablemente el tiempo de duración del tratamiento.

En los ensayos preliminares, se deben averiguar los siguientes parámetros: El grado de concentración necesario para conseguir la precipitación; el caudal de vino a través de la membrana, para conseguir el máximo rendimiento de la misma, y la temperatura óptima de almacenamiento del concentrado.

Como ventajas de este método podemos citar: su alto aprovechamiento de la energía, su construcción modular, lo que hace que la instalación sea fácilmente ampliable, el ocupar poco espacio y el fácil montaje y limpieza del sistema.

No obstante, este método tiene algunos inconvenientes: Requiere altas presiones de trabajo; existen dificultades prácticas para mantener activa la membrana (la eficacia máxima se logra en condiciones de turbulencia que retrasan la colmatación de la misma) y se necesita una alta concentración del vino para obtener un alto rendimiento, lo que hace necesaria una gran instalación.

Todos estos inconvenientes son de orden económico, lo que hace que la instalación sea costosa, aunque (Troost, 1985) el costo del mantenimiento del equipo no es muy elevado.

Los resultados del tratamiento, después de un almacenamiento de 48 horas a -4°C , parecen ser buenos para los vinos blancos e insuficientes para los tintos y rosados.

1.2.3 Técnicas de estabilización que eliminan la sobresaturación provocando la precipitación.

La utilización del frío para provocar la precipitación del KHT es la técnica de estabilización más utilizada. El sistema originalmente adoptado por las bodegas incluye un periodo de residencia de los vinos enfriados en depósitos termostatzados, no inferior a siete días, lo que supone inconvenientes desde el punto de vista económico. Estos inconvenientes han hecho que se busquen alternativas encaminadas a reducir el tiempo de residencia pretendiendo convertir la estabilización por frío en una operación continua o al menos semicontinua.

El rendimiento de esta operación se ve afectada por algunos factores inherentes al vino, que no es posible modificar, pero que es conveniente tener en cuenta tales como el grado alcohólico y el pH.

La aparición del etanol durante la fermentación es la principal causa de la sobresaturación que presentan los vinos respecto al KHT. A mayor grado alcohólico, para un mismo valor del producto de concentraciones, mayor sobresaturación y mayor facilidad para iniciar la nucleación. Esto explica el por qué los vinos de "cava" están entre los más afectados, ya que la segunda fermentación que tiene lugar en la botella en la que saldrá al mercado supone un aumento de la sobresaturación y con ella un mayor riesgo de aparición de cristales de KHT. Un mayor grado alcohólico del vino, permite disminuir la temperatura de tratamiento sin llegar a la congelación (Riberau-Gayon y col., 1977), lo que se debe procurar, con vistas a lograr la máxima sobresaturación.

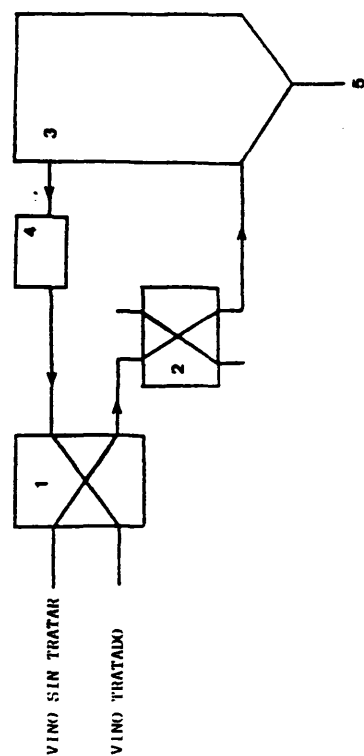
La proporción de ácido tartárico que se encuentra como ión bitartrato es función del pH del vino y, en menor medida, de su grado alcohólico. Para un vino de 10% alcohólicos, un pH próximo a 3.5, representa el máximo porcentaje de ácido tartárico como ión bitartrato, y facilita la precipitación del KHT. Por encima de este pH, aumenta rápidamente el porcentaje de ácido tartárico en forma de anión tartrato y por debajo de ese valor aumenta rápidamente el porcentaje de ácido tartárico neutro y ninguna de estas formas interviene en la sobresaturación del KHT.

Las sustancias ajenas a los iones precipitantes, también juegan un papel importante, aunque no muy bien conocido, en el rendimiento de la precipitación (Brugirard, 1979, Maujean y col., 1985 y 1986). La eliminación de los compuestos coloidales del vino aumenta el rendimiento de la precipitación (Berg y col., 1968) por lo que es conveniente utilizar clarificantes como la bentonita para vinos blancos y la bentonita-gelatina para los tintos y realizar un filtrado del vino lo más fino posible antes del tratamiento por frío.

1.2.3.1 Sistema de estabilización tradicional.

El esquema del tratamiento se muestra en la Figura 1.4. El proceso consta de las siguientes etapas:

- 1º) Filtración del vino a la temperatura de la bodega.
- 2º) Paso del vino a través de un intercambiador de calor (1) y de un equipo frigorífico (2), enfriándolo hasta una temperatura próxima a la de congelación (de -4° a -5°, en función del grado alcohólico).



-30-

Figura 1.4. Esquema de una instalación para el tratamiento por frío de los vinos según el sistema de estabilización tradicional. 1: Intercambiador de calor. 2: Equipo frigorífico. 3: Cristalizador. 4: Filtro. 5: Salida de tartratos.

3a) Estabulación del vino frío durante un cierto tiempo (7-10 días), en depósitos isotermos (3).

4a) Filtración del vino a la temperatura de tratamiento (4).

5a) Paso del vino tratado a través de un intercambiador de calor (1). En contracorriente con el vino tratado circula vino no tratado, con lo que se consigue un preenfriamiento del vino y un aumento del rendimiento del proceso.

El enfriamiento del vino debe ser lo más rápido posible (Riberau-Gayon y col., 1977; Colagrande y col., 1985; Silva y Mazzoleni, 1985) ya que así se favorece la formación de microcristales que actuarán como núcleos de cristalización, capaces de crecer a expensas de la sobresaturación existente en el vino.

La temperatura de almacenamiento debe ser lo más cercana posible al punto de congelación y mantenerse constante durante el tiempo que dura la estabulación, para mantener alta la sobresaturación inductora de la precipitación. Esto se puede conseguir, utilizando depósitos isotermos, o refrigerando los depósitos con aeroconvectores (Camp, 1982). La elección de la temperatura de tratamiento se debe hacer contemplando también los factores económicos que pueden encarecer el proceso. La temperatura óptima será aquella para la que se consiga la mayor precipitación en el menor tiempo y con el menor costo.

Otro parámetro a tener en cuenta es el de la relación superficie/volumen del depósito. Una relación superficie/volumen grande, aumenta la probabilidad de nucleación heterogénea sobre las paredes del mismo y con ella el rendimiento de la precipitación (Riberau-Gayon y col., 1977; Silva y Mazzoleni, 1985) aumentando también el rendimiento si no se retiran del depósito los cristales de

KHT procedentes de anteriores estabilizaciones, ya que actúan como núcleos de cristalización.

El filtrado final del vino debe ser lo más fino posible y se debe controlar estrictamente la temperatura a la que se realiza, ya que un aumento de la misma, supondría una solubilización de los núcleos formados.

1.2.3.2 Sistema Vinipal.

Cronológicamente fue la primera alternativa a la estabilización tradicional (Burnett, 1982).

Consta de las siguientes etapas:

- 1º) Filtración del vino a la temperatura de la bodega.
- 2º) Enfriamiento del vino hasta una temperatura próxima a la de su congelación pero sin llegar a ella.
- 3º) Circulación del vino a través de un cristalizador que dispone de agitación adicional. Quizás sea esta la operación crítica ya que se han de recircular las primeras partidas de vino hasta conseguir una población suficiente de cristales.
- 4º) Separación de los cristales formados, normalmente por filtración.

El esquema es semejante al de la Figura 1.4, con la única diferencia de introducir un sistema de circulación en el depósito de vino (3), que dispone de agitación adicional.

A favor de este método está la sencillez de funcionamiento y el corto tiempo de residencia. Como inconvenientes la gran disparidad de resultados observada en función del tipo de vino a tratar.

Una descripción detallada del método la han realizado Serrano y col. (1983), y permite sacar las siguientes conclusiones:

- Se necesita un reciclaje de las primeras partidas de vino de al menos 1 hora para conseguir resultados satisfactorios.
- Los productos de concentraciones alcanzados por este método son similares a los obtenidos por el sistema de estabulación clásica (6 días a -4°C).
- Cuando el sistema clásico no consigue la estabilización de los vinos, el sistema Vinipal tampoco lo logra.

1.2.3.3 Sistema Cristal-Flow.

Quizás sea el que introduzca más variaciones sobre el esquema general citado. En este sistema, el vino se enfría a una temperatura por debajo de su punto de congelación. Esto se hace, al igual que en todos los tratamientos basados en la utilización del frío para aumentar la sobresaturación. En este caso, el aumento de la sobresaturación se obtiene, además de por el descenso de la temperatura, por el aumento del grado alcohólico del vino, originado como consecuencia de la aparición de cristales de hielo.

Consta de las siguientes etapas (Figura 1.5):

- 1ª) Filtración del vino a la temperatura de la bodega.
- 2ª) Enfriamiento del vino hasta una temperatura por debajo de su punto de congelación (1, 2 y 3).
- 3ª) Conservación de la suspensión obtenida en depósitos isotermos con agitación (4). En esta etapa tiene lugar el crecimiento de los cristales de KHT formados en la primera etapa.

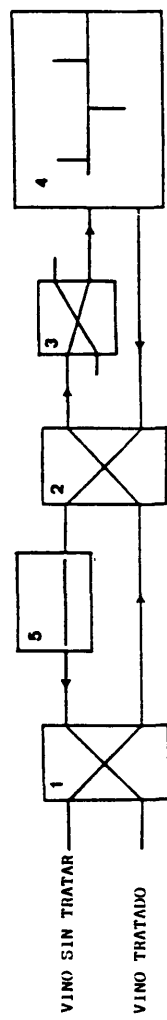


Figura 1.5. Esquema de una instalación para el tratamiento por frío de los vinos según el sistema Crystal-Flow. 1: Intercambiador de calor. 2: Intercambiador de calor (fusión de los cristales de hielo). 3: Equipo frigorífico. 4: Cristalizador con agitador. 5: Filtro.

4a) Fusión de los cristales de hielo formados con parcial recuperación de frigorías (2), que se utilizan para preenfriar el vino no tratado.

5a) Separación de los cristales de KHT formados por centrifugación o filtración (5).

6a) Recuperación de frigorías mediante un intercambiador de placas (1).

Entre las ventajas de este sistema cabe destacar las siguientes: Conduce a resultados uniformes independientemente del tipo de vino a tratar; el tiempo de residencia del vino en el cristalizador, es corto, lo que permite trabajar en continuo; se consigue una notable reducción en el producto de concentraciones del KHT, mejora la filtrabilidad de los vinos tratados (Blouin y Desenne, 1983) y hay una pérdida en anhídrido sulfuroso de alrededor del 13% del total, aunque acompañada de una ligera disminución de la densidad óptica a 420 nm (Perin, 1982)

Entre los inconvenientes citaremos que: Necesita muy buen aislamiento térmico y un riguroso control de la temperatura de trabajo en las diversas operaciones y que precisa una agitación intensa en el cristalizador ya que al trabajar a una temperatura por debajo del punto de congelación del vino, la viscosidad es muy alta.

1.2.3.4 Sistema de Contacto.

La principal aportación de esta técnica, consiste en la adición al vino frío, de cristales de KHT, finamente divididos que actuando de núcleos de cristalización aceleran y mejoran el rendimiento de la precipitación. Así se consigue una gran superficie sobre la que se

pueden depositar los iones potasio y bitartrato, reduciendo la interferencia de los posibles inhibidores.

Consta de las siguientes etapas (Figura 1.6):

- 1ª) Filtración del vino a la temperatura de la bodega.
- 2ª) Enfriamiento del vino sin llegar a la temperatura de congelación (1 y 2).
- 3ª) Adición de cristales de KHT (3).
- 4ª) Circulación del vino a través de un cristalizador con agitación (4).
- 5ª) Separación de los cristales de KHT formados por filtración o centrifugación (5).
- 6ª) Paso del vino a través de un intercambiador de calor (1) para la recuperación de frigorías, que se utilizan en preenfriar el vino no tratado.

Como ventajas de este método se pueden citar que proporciona resultados uniformes independientemente del tipo de vino a tratar; que el tiempo de residencia es corto; que se pueden conseguir productos de concentraciones inferiores a los alcanzados por el método clásico; y que permite trabajar a una temperatura más alta que en los otros casos citados, con el consiguiente ahorro energético.

Como inconvenientes se pueden citar los debidos a la operación de siembra de cristales de KHT ya que, aunque la carga económica no es grande, la manipulación debe ser cuidadosa. Estos cristales pueden recuperarse y reutilizarse varias veces en función del tipo de vino.

La operación de siembra de cristales de KHT durante el proceso de estabilización por frío de los vinos está autorizada por la C.E. desde el 1 de septiembre de 1980.

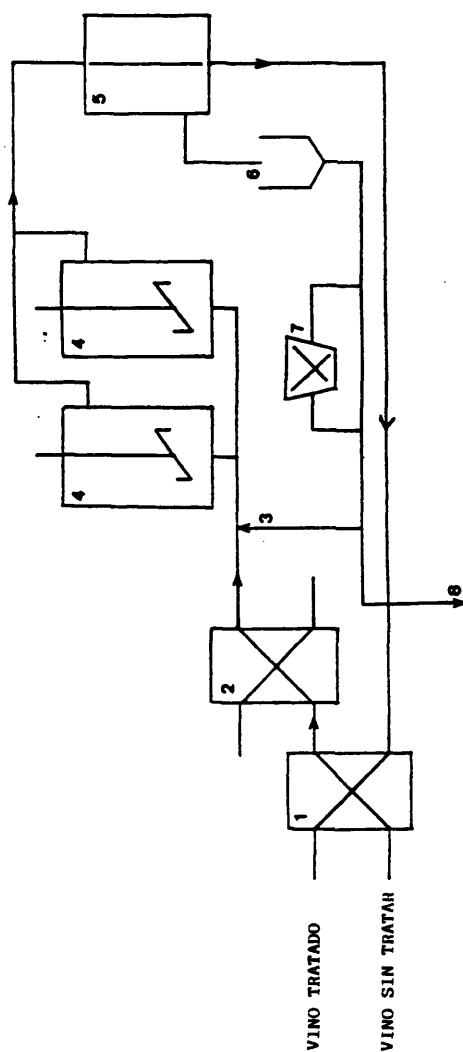


Figura 1.6. Esquema de una instalación para el tratamiento por frío de los vinos según el sistema de contacto. 1: Intercambiador de calor. 2: Equipo frigorífico. 3: Siembra de cristales. 4: Cristalizador con agitador. 5: Filtro. 6: Recuperación de tartratos. 7: Molino. 8: Salida de tartratos.

Se han realizado numerosos estudios sobre este método (Postel y Frasch, 1977; Blouin y col., 1979; Hagen, 1979; Rhein y Herardt, 1979; Dunsford y Boulton, 1981 a y b; Camp, 1982; Usseglio-Tomasset, 1982; Colagrande y col., 1985; Maujean y col. 1984, 1985 y 1986), aunque en ocasiones se considere la operación de siembra un mero complemento de algún otro tratamiento. La eficacia del método parece fuera de duda. Se presenta como un método seguro y barato, que permite trabajar en continuo, para conseguir vinos estables frente al KHT.

La elección de las condiciones de trabajo en la bodega requiere la realización de ensayos preliminares. Los parámetros a determinar, son: La cantidad y tamaño de los cristales a añadir así como la posibilidad de recuperación de los mismos; la temperatura de tratamiento; las necesidades de agitación y la forma de efectuarla, así como la duración del tratamiento.

Para la investigación de todos estos parámetros se suele utilizar la comparación con el método clásico y es conveniente someter las muestras de vino tratado a un test de estabilidad. La forma de asegurar la no aparición de cristales en la botella, es la de procurar una temperatura de saturación del vino respecto al KHT por debajo de la temperatura de transporte, almacenamiento y consumo, sin embargo, esto no es fácil de obtener. La temperatura de saturación de un vino tratado por frío, a -4°C , durante una semana, no suele ser inferior a 6 ó 7°C (Usseglio-Tomasset y Bosia, 1982), y tanto el consumo como el transporte de los vinos son susceptibles de descender por debajo de esa temperatura.

La industria enológica, parece decidirse por la utilización del frío para estabilizar a los vinos respecto a las precipitaciones

tartáricas. Esto obedece fundamentalmente a que el mismo equipo de frío se puede utilizar para el control de la temperatura en las distintas etapas de la elaboración.

Basados en este esquema operativo general, se investigan diversos complementos técnicos que pretenden aumentar el rendimiento de la precipitación. Uno de los más destacables, es la posibilidad de actuar sobre el estado coloidal del vino mediante tratamientos físicos de ultradispersión y ultrafiltración.

Hauschoffer y Szamalikier (1973) fueron los primeros en demostrar que un tratamiento de ultrasonidos simultáneo a la actuación del frío, aumentaba el rendimiento en la precipitación del KHT. Dubordieu y col. (1976), han demostrado que un tratamiento de ultradispersión puede tener el mismo efecto que los ultrasonidos en cuanto al aumento de la filtrabilidad de los vinos, pero no se ha podido comprobar la eficacia de esta técnica en la precipitación del KHT (Serrano y col. 1983). Por el contrario, la ultrafiltración ha sido utilizada con éxito para aumentar el rendimiento y la velocidad de precipitación del KHT (Escudier y col. 1987; Escudier y Moutonnet, 1987).

Otra modificación de interés, es la propuesta por Scott y col. (1981), quienes actuando con el esquema general de operación efectúan la filtración final del vino con una mezcla de tierra de diatomeas y KHT finamente dividido, lo que parece conducir a un mayor rendimiento en la precipitación. El objetivo de este filtrado, es obligar a circular al vino, sobresaturado en KHT, alrededor de una gran superficie de KHT cristalizado con lo que las posibilidades de precipitación aumentan. El fundamento de esta práctica es el mismo que

el del método de contacto, pero destaca la ingeniosa forma de llevarlo a cabo.

Rodríguez y col. (1987) han propuesto una interesante modificación al sistema de contacto, basada en la afinidad existente entre los cristales de KHT y los compuestos presentes en el vino capaces de inhibir la precipitación. Estos autores proponen la realización del sistema de contacto en dos partes: en la primera, que se realiza a la temperatura de saturación del vino respecto al KHT, se pone en contacto al vino con una gran superficie de cristales de KHT pretendiendo que los inhibidores se adsorban sobre estos siguiendo un mecanismo similar al que provoca la inhibición en la precipitación por frío. La segunda parte es similar al sistema de contacto descrito anteriormente. El aumento en el rendimiento de la precipitación del KHT conseguido es notable.

1.3 Consideraciones finales.

De lo anteriormente expuesto se desprende la importancia que el KHT del vino tiene como sistema tampón y los problemas que plantea por encontrarse a niveles de saturación.

De entre los diversos métodos que se pueden utilizar para eliminar el exceso de KHT los más eficaces y económicos son los basados en la utilización del frío que son los más extendidos en las bodegas. Desgraciadamente, estos tratamientos están rodeados de mucho empirismo, tanto por la complejidad del vino como por el desconocimiento de los mecanismos a través de los que transcurre la precipitación del KHT.

CAPITULO 2.

CINETICA DE LA CRISTALIZACION: ASPECTOS TEORICOS.

RESUMEN.

La cristalización puede considerarse como la sucesión de dos etapas: nucleación y crecimiento cristalino. Ambos pueden ocurrir según distintos mecanismos. En este capítulo se revisan conceptos fundamentales en el campo del crecimiento cristalino, prestando una atención especial a los aspectos cinéticos y a la influencia que los parámetros experimentales tienen sobre la cristalización.

2.1 SOBRESATURACION.

Habitualmente, se considera que la sobresaturación es responsable de los fenómenos de nucleación y crecimiento cristalino. Sin embargo, la verdadera fuerza motriz de los fenómenos de precipitación es la diferencia de potencial químico entre la solución sobresaturada y la solución saturada en condiciones de equilibrio. Esta diferencia se puede expresar, para el caso de un soluto que cristaliza en una solución binaria, como $\Delta\mu$:

$$\Delta\mu = \mu_1 - \mu_{\text{eq}} \quad [2.1]$$

donde μ_1 es el potencial químico de la solución sobresaturada y

μ_{eq} es el potencial químico de la solución en equilibrio.

El potencial químico se define en función del potencial químico standard, μ_0 , y de la actividad, a , como:

$$\mu_1 = \mu_0 + RT \ln a \quad [2.2]$$

y la verdadera fuerza inductora de la precipitación, adimensional es:

$$\Delta\mu/RT = \ln \beta \quad [2.3]$$

donde $\beta = a/a_{\text{eq}}$, es la sobresaturación de la solución y a_{eq} es la actividad de la solución saturada. A veces, se utiliza la sobresaturación relativa, σ :

$$\sigma = \beta - 1 \quad (2.4)$$

y la ecuación 2.3, queda:

$$\Delta \mu / RT = \ln (1 + \sigma) \quad (2.5)$$

que para bajas sobresaturaciones, $\sigma < 0.1$ se pueda sustituir por:

$$\Delta \mu / RT = \sigma \quad (2.6)$$

Sin embargo, la sobresaturación se suele expresar en términos de concentraciones, es decir:

$$S_c = c/c_{\text{eq}}, S_m = m/m_{\text{eq}}, S_x = x/x_{\text{eq}} \quad (2.7)$$

donde c = molaridad, m = molalidad y x = fracción molar. La relación entre todas ellas viene dada por:

$$\beta = S_c A_c = S_m A_m = S_x A_x \quad (2.8)$$

donde $A_c = Y_c/Y_{c,\text{eq}}$, $A_m = Y_m/Y_{m,\text{eq}}$, $A_x = Y_x/Y_{x,\text{eq}}$.

La elección de unas u otras unidades de la sobresaturación, a pesar de ser un número adimensional, lleva a valores diferentes de cada una de ellas (Mullin, 1978).

En general, en el campo del crecimiento de cristales, se suele elegir, la molalidad como forma habitual de expresar las concentraciones, dada su independencia de la temperatura. La desviación entre la sobresaturación fundamental, β , y la sobresaturación escogida viene dada por el cociente de actividades entre la solución sobresaturada y las condiciones de equilibrio, ecuación 2.7. Cuando este cociente se aleja mucho de la unidad, la diferencia entre concentración y actividad es notable y se ha de tener en cuenta. Para el caso de sales ligeramente solubles, como es el KHT,

las diferencias entre una y otra forma de expresar la concentración pueden ignorarse.

Para el caso de soluciones de una sal en la que los iones que la componen no se encuentran en cantidades estequiométricas, como es el caso del KHT en los mostos y en los vinos, la sobresaturación relativa, β , suele expresarse como el cociente entre el producto de actividades en la solución y el correspondiente a las condiciones de equilibrio, K_{ps} :

$$\beta = PA/K_{ps} \quad (2.9)$$

Según los distintos valores de β , nos podemos encontrar los siguientes casos:

- si $\beta = 1$, las concentraciones de los iones permanecerán constantes mientras no se introduzca ninguna modificación en el sistema.

- Si $\beta < 1$, habrá disolución de los cristales presentes hasta alcanzar el valor de 1 ó, si no es posible, el valor máximo posible (disolución total de los cristales).

- Si $\beta > 1$, se dan condiciones de sobresaturación y en presencia de cristales, estos crecerán hasta alcanzar las condiciones de equilibrio.

2.2 ZONA METAESTABLE.

Las condiciones de sobresaturación, reúnen todos los requisitos para que exista crecimiento cristalino, pero éste sólo tendrá lugar en presencia de núcleos o gérmenes de crecimiento. En ausencia de estos, una solución sobresaturada puede permanecer en condiciones metaestables por largos periodos de tiempo.

Un sistema sobresaturado tiende a evolucionar espontáneamente hacia el equilibrio, para lo cual debe eliminar el exceso de soluto. Esto puede ocurrir de dos maneras:

- a) engrosando cristales de soluto ya existentes.
- b) formando nuevos cristales.

Estos dos procesos no son excluyentes y pueden darse simultáneamente. Que predomine uno u otro dependerá (Jancic y Grootsohlten, 1985) del nivel de sobresaturación de la solución, y de las condiciones particulares de la solución, puesto que para cada proceso existe una barrera energética diferente.

2.3 NUCLEACION.

Ya se ha comentado que la existencia de la sobresaturación no es suficiente por sí sola para generar la aparición de un precipitado. Antes de que los cristales puedan crecer, deben existir en la solución gérmenes o núcleos de cristalización capaces de hacerlo. La transformación de una fase (el sólido disuelto en el disolvente), en otra (el sólido cristalino), es el proceso conocido con el nombre de nucleación y para que ocurra, se debe vencer la barrera energética que lleva asociada.

Cuando los núcleos se forman en soluciones perfectamente limpias sin participación de sustancias ajenas al cristal, el mecanismo a través del cual tiene lugar se conoce con el nombre de "nucleación homogénea". Cuando participan sustancias o superficies ajenas al cristal, tales como las paredes del recipiente, se habla de "nucleación heterogénea". Ambos son casos particulares de la "nucleación primaria".

Existe otro mecanismo, conocido con el nombre de "nucleación secundaria", que implica la preexistencia de cristales del soluto que cristaliza, a través del cual se induce la formación de cristales nuevos capaces de crecer. Este mecanismo tiene extraordinaria importancia en procesos industriales (Jancic y Grootsoolten, 1985).

Los tres mecanismos tienen en común la necesidad de una sobresaturación, lo que implica la existencia de una barrera energética no nula y distinta para cada caso, que se debe vencer para que tengan lugar.

2.3.1 Barrera energética de la nucleación homogénea.

La barrera energética asociada a una transición de fase es un concepto similar al de la energía de activación en una reacción química y se define (Nielsen y Christophersen, 1982) como el balance entre el trabajo necesario para crear una nueva superficie y la energía liberada a consecuencia de la restricción en la movilidad de las moléculas cuando entran a formar parte del sólido cristalino. Va a depender por tanto del número de iones que participen en su formación y, en consecuencia, del tamaño de ese núcleo que será termodinámicamente estable cuando la energía liberada a consecuencia de los enlaces creados sea mayor que el trabajo necesario para la formación de una superficie cristal-solución. Este núcleo, al que se le da el nombre de núcleo crítico, tiene, termodinámicamente, la misma probabilidad de crecer que de disolverse. Los núcleos menores que él, tenderán a disolverse.

La barrera energética, o la variación de energía libre, ΔG , para el caso de un cristal esférico e isotrópico, viene dada por la expresión:

$$\Delta G^* = 16 \pi Q^2 \gamma^3 / 3 [KT \ln(a/a_{\infty})]^3 \quad (2.10)$$

donde Q es el volumen molecular,

γ es la energía libre de superficie

K es la constante de Boltzmann

T la temperatura en grados Kelvin

a y a_{∞} son las actividades de las especies iónicas a la sobresaturación dada y en condiciones de saturación.

El radio de este núcleo, supuesto esférico, se puede demostrar que es:

$$r^* = 2 Q \gamma / KT \ln(a/a_{\infty}) \quad (2.11)$$

El factor $16\pi/3$, que aparece en la expresión de la energía libre, es un factor de forma, que puede ser reemplazado por un parámetro más general f , llamado factor de forma del núcleo. Para un núcleo cúbico de arista $2r$ ($S = 24r^2$ y $V = 8r^3$), f , toma el valor de 32.

El factor de forma no nos impide establecer la dependencia de la barrera energética con el resto de los parámetros que intervienen en la ecuación. Esta dependencia es directa con la energía libre de superficie, γ , e inversa con la temperatura, T , y el logaritmo de la sobresaturación $\beta = a/a_{\infty}$.

Para el caso de núcleos anisótropos, con distintas energías interfaciales para las diferentes caras del cristal, las expresiones son más complicadas y no aportan conceptos nuevos.

2.3.2 Barrera energética de la nucleación heterogénea.

Cuando en la formación del núcleo crítico, interviene una sustancia ajena a los iones precipitantes, la barrera energética para la nucleación es, en general, menor que cuando transcurre, exclusivamente, a través de un mecanismo de nucleación homogénea. En la práctica, la mayor parte de los casos de nucleación primaria transcurre a través de mecanismos de nucleación heterogénea, inducidas por partículas o superficies extrañas, difíciles de evitar, tales como las rugosidades de las paredes del recipiente y tiene lugar a menor sobresaturación.

El mecanismo a través del cual tiene lugar el descenso en la barrera energética no está completamente claro; parece ser que es debido a un proceso de ordenamiento local en las proximidades de la superficie de la partícula que reduce el valor de la barrera energética en un factor ϕ :

$$\Delta G^*_{\text{heter}} = \phi \Delta G^*_{\text{hom}} \quad [2.12]$$

El significado físico de ϕ es difícil de definir, por lo que se suele relacionar con el ángulo de contacto, θ , entre la superficie extraña y la del cristal. La relación entre ambas variables es (Garside, 1982):

$$\phi = (2 + \cos\theta) (1 - \cos\theta)^{2/4} \quad [2.13]$$

Cuando $\theta = 180^\circ$, $\phi = 1$, no hay afinidad entre la superficie extraña y el sólido cristalino, siendo la barrera energética la misma por los dos mecanismos. La absoluta afinidad entre el sólido cristalino y la superficie extraña corresponde a $\theta = 0$ y $\phi = 0$. Valores intermedios, corresponden a afinidades parciales y representan la capacidad de distintas superficies para facilitar la nucleación. La capacidad de una superficie dada para reducir el valor de la barrera energética es

difícil de predecir. Parece estar relacionada con semejanzas estructurales entre la impureza y el soluto a cristalizar, con la existencia de microfracturas en la superficie y con el tamaño de la impureza (Naumova y col. 1978; Garside, 1982).

2.3.3 Barrera energética para la nucleación secundaria.

Se entiende por nucleación secundaria la que tiene lugar cuando una solución sobresaturada en una sal, se agita en presencia de cristales de la misma. En estas condiciones, se generan cristales de tamaño superior al crítico capaces de crecer.

Para explicar este mecanismo se supone (Bujac, 1976, Strickland-Constable, 1976) que la nucleación secundaria es debida a distintas formas de fracturas de los cristales existentes en la solución, hipótesis que parece confirmarse en un gran número de sistemas (Jancic y Grootsholten, 1985). La mayor parte de los trabajos experimentales sobre este mecanismo se han realizado en sistemas agitados semejantes a los encontrados en cristalizadores industriales. Los factores que parecen tener mayor incidencia en la nucleación secundaria son fundamentalmente la sobresaturación y las características hidrodinámicas del cristalizador y en menor medida el tamaño y cantidad de cristales presentes y la existencia de impurezas.

2.4 PERIODO DE INDUCCION Y VELOCIDAD DE NUCLEACION.

Para que comience la nucleación, se debe alcanzar el tamaño del núcleo crítico que, en el caso de la nucleación homogénea, ocurrirá a través de choques entre los iones o moléculas disueltas. Al periodo de tiempo necesario para la formación y estabilización del núcleo

crítico, que coincide con el inicio del descenso apreciable de la concentración, se le conoce con el nombre de período de inducción, τ . La velocidad a la que el tamaño de los núcleos formados sobrepasan el tamaño crítico, se la conoce con el nombre de velocidad de nucleación, J , (Garside, 1982; Nielsen y Christophersen, 1982). La velocidad de nucleación, número de núcleos por unidad de tiempo y de volumen, es proporcional a $\exp(-\Delta G^*/KT)$ y, para el caso de la nucleación homogénea, recordando la ecuación 2.10 se puede escribir:

$$J = K' \exp(-16 \pi \Omega^2 \gamma^2 / 3 K^* T^3 \ln^2(a/a_m)) \quad (2.14)$$

Esta ecuación debe ser tratada con cautela ya que la nucleación homogénea puede ser inducida mediante estímulos mecánicos, como es la agitación y, por tanto, la dependencia con las distintas variables se ha de estudiar en las mismas condiciones hidrodinámicas.

El período de inducción está en relación inversa con la velocidad de nucleación (Garside, 1982), $J \propto \tau^{-1}$, por lo que una forma usual de estudiar la velocidad de nucleación es mediante la medida del período de inducción.

Es fácil comprender, que el período de inducción, va a depender en gran medida del método de detección utilizado. Entre los métodos usados para detectar el período de inducción están, entre otros, los contadores electrónicos de partículas (Jancic y Grootshliten, 1985), que determinan número y tamaño de las mismas, y los métodos conductimétricos (Koch y Schiller 1964; Strey y Kahlweit, 1978) que determinan el descenso en la concentración de soluto midiendo las variaciones en la conductividad de la solución.

Nielsen y Schoneel, 1971, estudiando la nucleación homogénea controlada por transporte, usando valores estimados de los parámetros

que intervienen, han demostrado que los tiempos de inducción pueden ser utilizados para evaluar la energía interfacial. Nielsen, 1984, ha relacionado la energía interfacial con la solubilidad de las sustancias.

Los valores de τ se ven fuertemente influidos por la presencia de impurezas y por las velocidades del crecimiento cristalino. La relación entre los mecanismos de nucleación homogénea, heterogénea, tiempo de inducción y energía interfacial no están completamente claros.

2.5 CRECIMIENTO CRISTALINO.

La condición necesaria para que un núcleo cristalino se desarrolle y crezca es la existencia de sobresaturación. Los fenómenos de nucleación y crecimiento en la precipitación, no son fáciles de separar. Se pueden considerar consecutivos para un mismo germén y simultáneos cuando se trata de una solución en la que hay un número muy grande de los mismos. Si después de la nucleación, persiste la sobresaturación, a esta etapa le sucede otra de crecimiento de los núcleos formados.

En los primeros estadios de la precipitación, la aparición de los núcleos ocurre a consecuencia de una intensa condensación de soluto que lleva consigo una disminución de la sobresaturación y, por tanto, un aumento del radio crítico, por lo que los núcleos más pequeños pueden tornarse termodinámicamente inestables y disolverse. Paralelamente, los más grandes crecen. Este fenómeno se conoce con el nombre de "envejecimiento de Ostwald" (Baronnet, 1982). El envejecimiento de Ostwald sólo se observa cuando el descenso de la

sobresaturación es mayor que el correspondiente crecimiento de los núcleos.

Para que tenga lugar el crecimiento del cristal han de sucederse las siguientes etapas:

- 1/ Transporte de las unidades de crecimiento hasta las caras del cristal.
- 2/ Destrucción de su estructura de solvatación y difusión de las moléculas de solvente liberado hacia la solución.
- 3/ Existencia de lugares capaces de incorporar las unidades de crecimiento, rincones, (iones o moléculas).
- 4/ Difusión superficial de las unidades de crecimiento hacia los centros activos de crecimiento en las caras del cristal.
- 5/ Reacción de integración en el cristal.

La velocidad de crecimiento vendrá determinada por la etapa más lenta de todas ellas, que va a depender del sistema en estudio.

Si el cristal presenta caras perfectamente planas, es decir, sin rincones, el crecimiento del mismo tendrá lugar por nucleación bidimensional sobre sus caras. El caso contrario, lo constituye un cristal con caras rugosas, esto es, con numerosos rincones, que permite la incorporación de las unidades de crecimiento nada más llegar a la superficie. La rugosidad de la superficie se evalúa a través del factor entrópico de superficie, o factor σ de Jackson (Bourne Davey, 1976, Bennema y Van der Herden, 1977).

La diferencia fundamental entre un cristal de caras planas y otro de caras rugosas, respecto a la incorporación de nuevas unidades de crecimiento, radica en el número de enlaces que puede formar cuando una nueva unidad de crecimiento llega al cristal. La importancia del

papel desempeñado por las interacciones soluto-solvente, en la condición de equilibrio de la cara (Bourne y Davey, 1976) va ser determinante, por lo que el factor α de Jackson se relaciona con la energía libre de superficie, γ :

$$\alpha = 4\gamma/RT \quad (2.15)$$

Para valores de $\alpha < 3.2$, la cara del cristal es rugosa y no existen barreras energéticas para el crecimiento a bajas sobresaturaciones. En estas condiciones, es posible que todas las unidades de crecimiento, que llegan a la superficie, se incorporen a ella.

Para superficies donde $3.2 < \alpha < 4.0$, la cara del cristal es plana, pero la nucleación bidimensional sobre ella no es difícil.

Para valores de $\alpha > 4$ la superficie es microscópicamente muy plana. El crecimiento a bajas sobresaturaciones no es posible por nucleación bidimensional.

En la práctica, se puede observar el crecimiento a muy bajas sobresaturaciones de cristales con un factor α relativamente alto, lo que indica que es posible otro mecanismo, más eficaz, de provisión de rincones que faciliten la integración de las unidades de crecimiento al cristal. Esta fuente de escalones que aparecen en la superficie del cristal tiene su origen en dislocaciones helicoidales, según el mecanismo propuesto por Burton y col. (1950).

2.6 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO.

Desde el punto de vista cinético, el crecimiento del cristal se puede considerar (Jancic y Grootsholten, 1985), como la sucesión de los dos mecanismos físicos siguientes:

1/ El transporte de soluto desde la solución hasta la capa de adsorción.

2/ El conjunto de reacciones que tienen lugar en la superficie del cristal.

El concepto de crecimiento de cristales como una cadena de procesos en serie, permite postular que la resistencia global y la constante de velocidad de la reacción, serán la suma de las correspondientes a los dos mecanismos (Garside, 1971).

La velocidad de crecimiento será función por tanto de la fuerza inductora de la precipitación, a través de la sobresaturación, y de la velocidad a la que transcurren los procesos de transferencia de masa y de integración:

$$dC/dt = f(\Delta c, K_s, K_r) \quad (2.16)$$

La reacción de transferencia de materia, se describe convencionalmente mediante la ecuación:

$$dC/dt = K_s (C^* - C_s) \quad (2.17)$$

donde dC/dt es la variación de la concentración en la solución, K_s es la constante de velocidad de esta reacción, C^* es la concentración en la solución y C_s es la concentración de soluto en la superficie del cristal.

La reacción de superficie correspondiente al proceso de integración toma la forma empírica:

$$dC/dt = K_r (C_s - C^\infty)^r \quad (2.18)$$

donde K_r es la constante de velocidad correspondiente al proceso de integración y C^∞ es la concentración de la solución en condiciones de equilibrio, y r es el orden de la reacción de integración.

Si suponemos que la reacción de integración es de primer orden y la velocidad de crecimiento viene dada por:

$$G = K_1 (C' - C^*) \quad [2.19]$$

Cuando la reacción de integración es de orden superior a 1, algunos autores utilizan con éxito, la ley empírica:

$$G \propto \Delta C^n \quad [2.20]$$

para correlacionar la velocidad de crecimiento con la fuerza inductora de la precipitación.

2.7 CINÉTICA DE LA PRECIPITACION.

Una cinética de precipitación de primer orden, supone una dependencia directa de la velocidad en el descenso de la concentración de soluto, en nuestro caso del descenso en conductividad, con el tiempo:

$$dC/dt = - K_1 (C - C_{\infty}) \quad [2.21]$$

donde K_1 es la constante de velocidad de la reacción de precipitación. Por separación de variables e integración, esta ecuación se convierte en:

$$\ln (C - C_{\infty}) / (C_0 - C_{\infty}) = - K_1 t \quad [2.22]$$

Durante la reacción de precipitación, la concentración de soluto puede medirse por alguna propiedad que varíe proporcionalmente con ella, como la conductividad específica de la solución, X , si la dependencia entre ambas es lineal se obtiene :

$$\ln (X - X_{\infty}) / (X_0 - X_{\infty}) = - K_1 t \quad [2.23]$$

que al representar el cociente, tiene la ventaja de que se elimina la constante de proporcionalidad entre la concentración y la conductividad. La representación de $\ln(X - X_{\infty}) / (X_0 - X_{\infty})$ frente al

tiempo debe dar una recta de pendiente igual a la constante de la reacción de precipitación.

Una cinética de precipitación de segundo orden, significa que el descenso en la concentración de soluto viene regulada por una ley del tipo:

$$dC/dt = K_2 (C - C_{\infty})^2 \quad [2.24]$$

que por separación de variables e integración nos conduce a:

$$(C - C_{\infty})^{-1} - (C_0 - C_{\infty})^{-1} = K_2 t \quad [2.25]$$

Al sustituir concentración por conductividad, obtenemos:

$$(X - X_{\infty})^{-1} - (X_0 - X_{\infty})^{-1} = K'_2 t \quad [2.26]$$

donde K'_2 es distinta a la que aparece en la ecuación anterior, ya que la ecuación que relaciona la conductividad con la concentración tiene término independiente no nulo. La representación de $(X - X_{\infty})^{-1}$ frente al tiempo debe ser una recta de pendiente igual a K'_2 .

2.8 INFLUENCIA DE LOS LOS PARAMETROS EXPERIMENTALES.

Generalmente se acepta que tanto la transferencia de materia como la reacción de integración, aumentan con la sobresaturación. También que las características hidrodinámicas de la solución afectan selectivamente a la transferencia de materia mientras que factores como la temperatura y las impurezas influyen casi exclusivamente en las reacciones de superficie. Variando las condiciones experimentales, se puede variar la contribución relativa de ambos procesos.

Los mecanismos de nucleación dependen en gran medida de las condiciones particulares de cada sistema. La temperatura, la

sobresaturación y la agitación, junto con el tamaño del cristal son los principales responsables de las variaciones observadas.

2.8.1 Sobresaturación.

En condiciones de agitación y temperatura constante, un aumento de la sobresaturación se traduce, recordando las ecuaciones 2.10 y 2.11, en una disminución del radio crítico y descenso de la barrera energética.

En todo proceso de nucleación, sobre todo a grandes sobresaturaciones, la condensación del soluto es muy intensa y hace descender notablemente la sobresaturación y si la velocidad de crecimiento de los núcleos formados es menor que el correspondiente aumento del tamaño crítico, puede darse el fenómeno de envejecimiento de Ostwald ya comentado.

El estudio de las leyes de crecimiento a distintas sobresaturaciones se puede utilizar para discernir la etapa controlante del crecimiento.

2.8.2 Temperatura.

La influencia de la temperatura se puede estudiar recurriendo a las ecuaciones 2.10 y 2.11. Un aumento de la temperatura, en condiciones de sobresaturación y agitación constantes, se traduce en una disminución del tamaño del núcleo crítico y paralelamente en una disminución de la barrera energética para la nucleación.

2.8.3 Agitación.

Las teorías para explicar la dependencia de la nucleación con la agitación se corresponden con una mayor movilidad de los iones, aumentando el número de choques interiónicos y la probabilidad de formación de agregados de tamaño crítico. La agitación se puede suponer que tiene un efecto similar a la temperatura. El aumento de vibraciones moleculares y el aumento de la agitación lleva consigo un descenso de las barreras energéticas asociadas tanto a la nucleación como al crecimiento cristalino.

No podemos olvidar que la nucleación es un fenómeno gobernado por difusión de las unidades de crecimiento hacia los lugares privilegiados de nucleación, y la agitación favorece la difusión acelerando la nucleación. Las experiencias realizadas sobre el efecto de la agitación en la cinética de cristalización permiten hacer las siguientes observaciones (Rodríguez, 1976):

1) A sobresaturación y temperatura constante, el aumento de la agitación se traduce en aumento de la velocidad de crecimiento y en disminución del período de inducción para la nucleación. A partir de un determinado valor crítico, característico para cada sistema, no aumenta la eficacia de la agitación.

2) A temperatura constante, el valor de la agitación crítica disminuye con la sobresaturación.

3) A sobresaturación constante la agitación crítica disminuye con la temperatura.

Una vez formado el cristal, la agitación se traduce en una disminución del espesor de la capa de adsorción y, por tanto, un

aumento en el gradiente de concentración en las proximidades del cristal y una mayor fuerza inductora del crecimiento.

La influencia de la agitación en el crecimiento (Nielsen, 1981) es máxima cuando la etapa controlante del crecimiento está gobernada por el transporte de materia desde la solución hasta el cristal. Cuando la etapa controlante corresponde a reacciones superficiales, la agitación es menor y se alcanza rápidamente el valor crítico.

Cuando se estudia la influencia de la agitación sobre el crecimiento se ha de tener muy en cuenta el tamaño de los núcleos (Nielsen y Christophersen, 1982), ya que cuando estos son muy pequeños, $< 5 \mu\text{m}$, son arrastrados por la solución y la influencia es pequeña.

2.8.4 Efecto del tamaño del cristal.

McCabe, en 1929, postuló que "todos los cristales, independientemente de su tamaño, crecen a la misma velocidad". Sin embargo, las características particulares de cada cristal (presencia de microfracturas, dislocaciones, impurezas) hacen difícil la comparación de las condiciones de crecimiento de dos cristales, aún del mismo tamaño. Experimentalmente, se observa al estudiar el crecimiento de monocristales lo que se conoce con el nombre de dispersión de crecimiento (dispersion growth) (Mullin, 1967; Veintemillas, 1986) que se debe explicar teniendo en cuenta la peculiaridad de cada cristal, que hace posible distinguirlo de otro aparentemente igual a él. El orden microscópico característico de la materia cristalina hace que pequeñas diferencias puedan traducirse en distintas velocidades de crecimiento. En el estudio de la cinética de

precipitación, con la presencia de un gran número de núcleos, no vamos a considerar las diferencias entre los mismos.

La influencia del tamaño del cristal, debe ser discutida, además, desde el punto de vista termodinámico, estudiando la variación de la solubilidad, y por tanto de la sobresaturación, con el tamaño de grano del cristal, y desde el punto de vista cinético, ya que de las dimensiones del cristal van a depender las características dinámicas del sistema estudiado en condiciones de agitación.

Para estudiar las características dinámicas de cada sistema, hay que tener en cuenta que la eficacia de la agitación será máxima, en condiciones de turbulencia. En condiciones de flujo laminar, la eficacia de la agitación dependerá de la velocidad relativa entre los cristales y el fluido en el que se mueven.

En un líquido estático, la velocidad relativa, u , viene a ser la velocidad límite de caída de Stokes, que para el caso de partículas esféricas toma el siguiente valor:

$$u = g D_c (\rho_c - \rho) / 18\eta \quad [2.27]$$

donde g es el valor de la gravedad, en ft/s^2

D_c es el diámetro del cristal, en ft

ρ_c es la densidad del cristal, en lb/ft^3

ρ es la densidad del líquido, en lb/ft^3

y η es la viscosidad del mismo, en lb/ft s .

Cuando el líquido esta en movimiento, el factor que condiciona el valor de la velocidad relativa es la inercia de las partículas. Cuanto mayor sea la inercia, mayor será la diferencia de velocidades entre la partícula y el líquido. Si la inercia es cero, la velocidad relativa será cero y las partículas acompañaran al fluido en su movimiento.

Para evaluar esta velocidad relativa se puede utilizar el coeficiente de arrastre, C_d , (Perry y Chilton, 1974) que representa el cociente entre las fuerzas gravitacionales y de inercia, que actúan sobre la partícula:

$$C_d = (\rho_s - \rho) D_p g / \rho v^2 = K^2 D_p / v^2 \quad [2.28]$$

donde v es la velocidad de circulación del fluido.

A un coeficiente de arrastre grande corresponde un predominio de la sedimentación, lo que equivale a sentenciar a la partícula a que se deposite en el fondo del recipiente.

Se puede evaluar de forma aproximada, tomando como diámetro del cristal el final de la experiencia, ya que si no hay efecto al final menos lo habrá al principio. El problema radica en escoger la velocidad de circulación que debe estar relacionada con una componente vertical de la misma.

Basándose en resultados experimentales, Nielsen y Christophersen, 1982, propone, como tamaño mínimo para una agitación eficaz de 5 μm . Sin embargo, este valor puede variar con el sistema estudiado. Los parámetros que habrá que tener en cuenta son: la forma del cristal, la diferencia de densidades entre el cristal y el líquido, además de las características dinámicas del sistema (la forma del agitador y del recipiente).

CAPITULO 3

FISICO-QUIMICA DE LAS SOLUCIONES TARTARICAS.

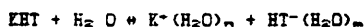
RESUMEN.

Comparar al vino con una solución hidroalcohólica saturada en KHT es una aproximación útil para discutir los aspectos termodinámicos de los procesos que tienen lugar en su seno. La participación del resto de los componentes del vino se reduce a la influencia sobre la fuerza iónica del medio que se hará notar, a través del coeficiente de actividad, en las constantes de equilibrio. En este capítulo se consideran los factores fisicoquímicos que afectan a las constantes de equilibrio, incluyendo todas las tablas necesarias para el cálculo de la sobresaturación en KHT de un vino. Se estudia la influencia del tamaño de grano sobre la solubilidad, se establecen los criterios para la elección del tamaño de grano de los cristales de KHT en las experiencias con siembra y se propone la medida de la conductividad específica como método para conocer la concentración del ión potasio en soluciones hidroalcohólicas y en vinos.

3.1 SOLUBILIDAD DEL KHT.

El KHT es un electrolito 1:1 ligeramente soluble en agua y su comportamiento en solución puede ser descrito por la teoría de Debye Huckel.

La disolución consiste, desde el punto de vista físico-químico, en la creación de enlaces entre los iones que forman el cristal y las moléculas polares del agua, disminuyendo así las fuerzas electroestáticas entre aquellos. Este fenómeno se puede representar mediante la ecuación:



donde m y n son los números de solvatación del anión y del catión respectivamente. En una solución saturada, todas las moléculas de solvente ejercen acciones de solvatación a través de sucesivas esferas de coordinación apantallando las atracciones electrostáticas entre los iones, mediante la red del líquido solvente no destruida por la acción del electrólito.

El ión potasio tiene poca afinidad por el agua (Samoilov, 1965) por lo que el efecto principal se puede suponer debido a la acción del ión bitartrato. El aumento de la solubilidad de una sal con la temperatura es debido a la mayor facilidad de intercambio entre las moléculas de hidratación y el resto de las moléculas de agua, lo que suministra mayor cantidad de moléculas de solvente como agentes de solvatación o apantalladores de iones, o al aumento de la interacción interiónica con la formación de pares.

El agua es un disolvente con una constante dieléctrica alta ($\epsilon = 78.5$), mucho mayor que la del etanol ($\epsilon = 24.3$). Debido a esto, si se aumenta la concentración de etanol en una solución acuosa de un electrólito, disminuye la constante global del solvente y hace aumentar las fuerzas electrostáticas entre los iones cargados, formándose pares de contacto o moléculas neutras con la consiguiente precipitación de la fase sólida del electrólito.

La solubilidad del KHT depende por tanto, en primera instancia del contenido alcohólico de la solución y de la temperatura. Entre los valores calculados por distintos autores existían diferencias debidas, probablemente, a la influencia de otros factores tales como la presencia de impurezas, el pH, el tiempo que se tarda en alcanzar el equilibrio, la influencia de la fuerza iónica o la dificultad del

cálculo de la concentración de ión bitartato que participa simultáneamente en los equilibrios de disociación de su ácido. Berg y Keefer en 1958 calcularon, el valor de la solubilidad del KHT en mezclas hidroalcohólicas, recogiendo los trabajos anteriores y teniendo en cuenta el efecto de todas estas variables (Figura 1.2).

Cuando se desea provocar la precipitación del KHT, aún hay otro factor que debe ser tenido en cuenta, en particular cuando se incluye la operación de siembra de cristales para activar la precipitación, y es la dependencia de la solubilidad de la sal con el tamaño de grano. Por este motivo hemos considerado conveniente efectuar el estudio de esta dependencia mutua.

3.1.1 Constantes de disociación del ácido tartárico.

Los equilibrios de disociación del ácido tartárico y sus correspondientes constantes de equilibrio son:



$$K_1 = \frac{[H^+][HT^-]}{[H_2T]} \quad [3.1]$$

y



$$K_2 = \frac{[H^+][T^{2-}]}{[HT^-]} \quad [3.2]$$

Si en vez de utilizar concentraciones, se sustituyen éstas por el término más riguroso de actividades, obtenemos las constantes de disociación termodinámicas:

$$K_1 \tau = \frac{(H^+)(HT^-)}{(H_2T)} \quad [3.3]$$

y

$$K_{2\tau} = \frac{(H^+)(T^{2-})}{(HT^-)} \quad [3.4]$$

Para conocer la concentración del ión bitartrato en una solución dada, es preciso conocer las constantes de disociación del ácido tartárico en esa solución.

Los valores de estas constantes de equilibrio (Tabla 3.1) y su variación con la fuerza iónica de la solución (Tabla 3.2), fueron calculados, también por Berg y Keefer (1958) y posteriormente confirmados por Usseglio-Tomasset y Bossia (1978), por lo que se han convertido en las Tablas clásicas de consulta.

Para un valor constante de la fuerza iónica, la variación de las constantes de disociación con la temperatura es pequeña y no merece la pena tenerla en cuenta (Berg y Keefer, 1958 y 1959).

3.1.3 Determinación del porcentaje de bitartrato en las soluciones.

Para un valor dado de las constantes de disociación del ácido tartárico en unas condiciones determinadas (grado alcohólico, temperatura y fuerza iónica), la cantidad de dicho ácido presente en solución en forma de ión bitartrato dependerá del pH de la misma. Estos cálculos fueron efectuados, al igual que los anteriores, por Berg y Keefer (1958) y Usseglio-Tomasset y Bossia (1978), y se muestran en la Tabla 3.3.

3.1.3 Fuerza iónica de los vinos.

La fuerza iónica de una solución es una medida del campo eléctrico presente en la misma. Intenta evaluar los efectos no específicos de las cargas eléctricas que aportan las especies iónicas presentes en la solución. La definición matemática es:

$$I = \frac{1}{2} \sum (Z^2 \cdot [M]) \quad [3.5]$$

Tabla 3.1. Constantes de disociación del ácido tartárico en soluciones de 0, 10 y 20 grados alcohólicos (Berg y Keefer, 1958).

	Constantes de concentración						Constantes termodinámicas				
	0	10		20			0	10		20	
% v/v	20°C	-42°C	20°C	-42°C	20°C	20°C	20°C	-42°C	20°C	-42°C	20°C
$K_1 \cdot 10^{-4}$	10,71	6,96	8,92	5,63	7,22	9,02	6,36	7,66	5,24	6,31	
$K_2 \cdot 10^{-4}$	7,10	3,65	5,05	2,23	3,06	4,25	2,78	3,20	1,79	2,05	

Tabla 3.2. Efecto de la variación de la fuerza iónica, I, sobre las constantes de disociación, K_1 y K_2 , el pH y el HT⁻ a 20°C y 20 % de alcohol (Berg y Keefer, 1958).

I	K_1	K_2	pH	%HT ⁻
0,016	$7,37 \cdot 10^{-4}$	$3,28 \cdot 10^{-4}$	3,81	70,2
0,038	$7,92 \cdot 10^{-4}$	$4,05 \cdot 10^{-4}$	3,75	68,9
0,056	$8,22 \cdot 10^{-4}$	$4,56 \cdot 10^{-4}$	3,71	68,0

Tabla 3.3. Variación del porcentaje de HT^- en vinos, con el pH y el grado alcohólico, a 20° C y fuerza iónica de 0,038 (Berg y Keefer, 1958).

Grado alcohólico:									
10		11		12		13		14	
pH	% HT^-	pH	% HT^-	pH	% HT^-	pH	% HT^-	pH	% HT^-
2,81	37,7	2,83	38,0	2,84	38,3	2,85	38,6	2,87	38,9
2,91	42,9	2,93	43,2	2,94	43,5	2,95	43,8	2,97	44,1
3,01	48,1	3,03	48,4	3,04	48,7	3,05	49,0	3,07	49,3
3,11	53,0	3,13	53,3	3,14	53,6	3,15	53,9	3,17	54,2
3,21	57,4	3,23	57,7	3,24	58,0	3,25	58,3	3,27	58,6
3,31	61,1	3,33	61,4	3,34	61,7	3,35	61,9	3,37	62,2
3,41	63,9	3,43	64,2	3,44	64,4	3,45	64,7	3,47	65,0
3,51	65,6	3,53	65,9	3,54	66,2	3,55	66,4	3,57	66,7
3,61	66,2	3,63	66,5	3,64	66,7	3,65	67,0	3,67	67,3
3,71	65,6	3,73	65,9	3,74	66,1	3,75	66,4	3,77	66,7
3,81	63,9	3,83	64,1	3,84	64,4	3,85	64,7	3,87	65,0
3,91	61,1	3,93	61,4	3,94	61,7	3,95	61,9	3,97	62,2
4,01	57,4	4,03	57,7	4,04	58,0	4,05	58,3	4,07	58,6
4,11	53,0	4,13	53,3	4,14	53,6	4,15	53,9	4,17	54,2
4,21	48,1	4,23	48,4	4,24	48,7	4,25	49,0	4,27	49,3

donde $[M]$ es la concentración de cada uno de los iones, de carga Z_m , presentes en la solución.

Conocer la fuerza iónica real de un medio biológico, como es el vino, es una labor poco menos que imposible ya que implica la determinación de la concentración de todas las especies químicas cargadas presentes, por lo que normalmente se recurre a aproximaciones. Esta es una forma común de actuación en los medios biológicos con la que no se cometen grandes errores (Robertson, 1982).

Berg y Keefer (1958) calculan la fuerza iónica de los vinos haciendo uso de los valores medios de todos los constituyentes inorgánicos presentes en el vino. Ussaglio-Tomassot y Bossia, 1978 y 1982, en vinos italianos y Echeverría 1980, en vinos españoles, comparan el valor de la fuerza iónica calculada por dos métodos diferentes: uno por el análisis de la acidez intercambiable y otro, determinando el contenido en cationes mayoritarios (potasio, calcio, magnesio, sodio y hierro), suponiéndolo igual al de aniones y todos ellos monovalentes. Las desviaciones por uno y otro método son muy pequeñas, menores del 2%.

Al ser el potasio el catión mayoritario, la principal variación en la fuerza iónica se va a producir durante la precipitación del KHT. Echeverría, 1980, ha calculado el valor de la fuerza iónica en vinos blancos del Penadés, antes y después de ser sometidos a refrigeración para la extracción del exceso de KHT de los mismos, encontrando una fuerza iónica media de 0.03 antes de la refrigeración y de 0.02 después de la misma. Los valores encontrados por nosotros en el laboratorio por análisis de los cationes mayoritarios no difieren de estos.

3.1.4 Coefficientes de actividad.

Una vez conocida la fuerza iónica se puede calcular el coeficiente de actividad, A , de un ión de carga Z_i presente en la solución:

$$\log A_i = - Z_i^2 A \sqrt{I} (1 + B \sqrt{I})^{-1} \quad [3.6]$$

donde A y B son constantes para cada temperatura y cada constante dieléctrica de la solución (Ussaglio-Tomassot y Bosia, 1978).

Vemos que el coeficiente de actividad es función de la temperatura, de la constante dieléctrica y de la fuerza iónica de la solución. En el cálculo del mismo para cada caso particular es difícil no tener que recurrir a las aproximaciones, para evaluar la fuerza iónica, aún así los errores cometidos no son importantes. Como valores medios se pueden tomar los dados por Llaguno (1983), que corrigen las diferencias entre la solubilidad y el producto de solubilidad (Tabla 3.4).

3.1.5 Producto de solubilidad y producto de concentraciones.

El producto de concentraciones de una solución de KHT es:

$$P.C. = [K^+][HT^-] \quad [3.7]$$

Esta ecuación se puede usar cuando se trata de una solución hidroalcohólica, ya que por valoración ácido-base con fenolftaleína como indicador, se puede calcular la concentración de ión bitartrato.

En vinos no existe esta posibilidad y se valora el contenido total en ácido tartárico por lo que se ha de conocer también el pH y recurrir a la siguiente ecuación:

$$P.C. = [K^+](H_2T) \frac{1}{[HT^-]} \quad [3.8]$$

Tabla 3.4. Coeficientes de actividad de los iones K^+ y H^+ , en función de la temperatura y el grado alcohólico (Llaguno, 1983).

Temperatura °C	Grado alcohólico				
	10	11	12	13	14
-4	0,9075	0,9145	0,9220	0,9290	0,9350
-3	0,9073	0,9120	0,9195	0,9265	0,9325
-2	0,9036	0,9095	0,9170	0,9240	0,9300
-1	0,9000	0,9070	0,9145	0,9215	0,9275
0	0,8975	0,9045	0,9120	0,9190	0,9250
1	0,8950	0,9021	0,9095	0,9165	0,9225
2	0,8925	0,8997	0,9070	0,9140	0,9200
3	0,8900	0,8973	0,9045	0,9115	0,9175
4	0,8875	0,8950	0,9020	0,9090	0,9150
5	0,8850	0,8925	0,8995	0,9065	0,9125
6	0,8826	0,8900	0,8970	0,9039	0,9099
7	0,8802	0,8875	0,8945	0,9013	0,9073
8	0,8778	0,8850	0,8920	0,8987	0,9047
9	0,8754	0,8825	0,8895	0,8961	0,9021
10	0,8730	0,8800	0,8700	0,8935	0,8995
11	0,8705	0,8775	0,8845	0,8910	0,8969
12	0,8680	0,8750	0,8820	0,8885	0,8943
13	0,8625	0,8725	0,8795	0,8860	0,8917
14	0,8630	0,8700	0,8770	0,8835	0,8891
15	0,8605	0,8675	0,8745	0,8810	0,8865
20	0,8480	0,8550	0,8620	0,8685	0,8740

donde $\%T^-$ es el porcentaje de ácido tartárico en forma de 16a bitartrato que viene dado en función del pH y del grado alcohólico del vino en la Tabla 3.3.

Si en vez de utilizar concentraciones se hace el cálculo, más riguroso, con actividades esta ecuación pasa a ser:

$$P.A. = (K^+)(H_2T)\%T^- \quad [3.9]$$

que en "condiciones de saturación" se convierte en el producto de solubilidad del KHT.

La relación entre el producto de actividades y el de concentraciones viene dado por:

$$P.A. = P.C. \cdot A_{\pm}^2 \quad [3.10]$$

El producto de solubilidad del KHT ha sido calculado (Berg y Keefer, 1958) para soluciones hidroalcohólicas en función de la temperatura y grado alcohólico para una fuerza iónica de 0.038 y se muestra en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Producto de solubilidad del KHT ($\times 10^{-6}$) en soluciones a una fuerza iónica de 0,038 (Berg y Keefer, 1958).

Grado alcohólico	Temperatura					
	-4°C	0°C	5°C	10°C	15°C	20°C
10	25,6	36,0	56,0	89,3	128,0	197,0
11	22,8	32,4	50,1	80,5	118,0	180,0
12	20,3	29,0	45,0	72,9	108,0	164,0
13	18,2	25,9	40,1	66,0	99,0	150,0
14	16,2	23,2	36,0	59,7	91,0	136,0

3.1.6 Cálculo de la sobresaturación.

Para el cálculo de la sobresaturación en KHT de una solución o de un vino, se necesita conocer las siguientes datos analíticos:

- grado alcohólico.
- pH.
- fuerza iónica.
- concentración de potasio.
- concentración de ácido tartárico.

y mediante el uso de tablas, se puede calcular, extrapolando si es necesario, el porcentaje de ácido tartárico como ión bitartrato (Tabla 3.3) y el producto de solubilidad (Tabla 3.5). La sobresaturación se suele expresar en forma de sobresaturación relativa, σ :

$$\sigma = \beta_{\text{act}} - 1 \quad [3.11]$$

donde β_{act} es el cociente entre el producto de actividades en la solución y el producto de solubilidad termodinámico.

3.1.7 Estudio de la interdependencia entre el tamaño de grano y la solubilidad del KHT en soluciones agua alcohol.

La distinta solubilidad de los cristales de una sal según su tamaño, se relaciona con diferencias de estabilidad y debe ser explicada en términos termodinámicos (Stummer y Morgan, 1983). Por tanto, para discutir la dependencia del tamaño de grano con la solubilidad partiremos de la ecuación que expresa la energía libre, ΔG , asociada a la formación de un núcleo crítico, ecuación 2.10:

$$\Delta G = 16 \pi \sigma^2 r^3 / 3 (RT \ln \beta)^2 \quad [2.10]$$

y la correspondiente al tamaño del núcleo crítico, r^* , para una sobresaturación, β , ecuación 2.11:

$$r^* = 2 \sigma \gamma / kT \ln \beta \quad (2.11)$$

donde σ es el volumen molar,

γ es la energía libre de superficie,

k es la constante de Boltzman y

T es la temperatura absoluta.

La dependencia de la solubilidad, S , con el tamaño de grano puede expresarse mediante la ecuación de Freundlich-Ostwald (Stummer y Morgan, 1983):

$$\log S_r = \log S_\infty + \gamma(2A/3)/2,3 kT \quad (3.12)$$

donde S_r es la solubilidad de la sal de tamaño de grano r ,

S_∞ es la solubilidad teórica de la sal frente a un cristal de dimensiones infinitas y

A es el área de un mol de partícula de tamaño r .

Para el estudio de esta dependencia necesitamos conocer la energía libre de superficie, γ , que se calcula en el capítulo 4. según Nielsen y Christophersen (1982) con los datos de la solubilidad dados por Berg y Keefer (1958), a 0° C y 11 grados alcohólicos:

$$\gamma = 47,83 \text{ erg/cm}^2$$

El área de un mol de partículas la obtenemos suponiendo cúbicos los cristales de KHT.

Ahora estamos en disposición de estudiar la ecuación de Freundlich-Ostwald de la que obtenemos los datos que se muestran en la Tabla 3.6.

Vemos que para valores del radio del cristal menores de $10^{-2} \mu\text{m}$, la influencia del tamaño de grano en la solubilidad es apreciable. Por encima de este valor, la solubilidad no experimenta variaciones dignas de ser consideradas.

Tabla 3.6. Solubilidad del KHT en función del tamaño de grano.

r (μm)	10^2	10	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
$a = 4\pi r^2$ (cm^2)	$1,26 \cdot 10^{-3}$	$1,26 \cdot 10^{-5}$	$1,26 \cdot 10^{-7}$	$1,26 \cdot 10^{-9}$	$1,26 \cdot 10^{-11}$	$1,26 \cdot 10^{-13}$
$V = 4\pi r^3/3$ (cm^3)	$4,19 \cdot 10^{-6}$	$4,19 \cdot 10^{-9}$	$4,19 \cdot 10^{-12}$	$4,19 \cdot 10^{-15}$	$4,19 \cdot 10^{-18}$	$4,19 \cdot 10^{-21}$
nº partículas/mol	$2,29 \cdot 10^7$	$2,29 \cdot 10^{10}$	$2,29 \cdot 10^{13}$	$2,29 \cdot 10^{16}$	$2,29 \cdot 10^{19}$	$2,29 \cdot 10^{22}$
Area molar (cm^2)	$2,89 \cdot 10^4$	$2,89 \cdot 10^6$	$2,89 \cdot 10^8$	$2,89 \cdot 10^{10}$	$2,89 \cdot 10^{12}$	$2,89 \cdot 10^{14}$
$\gamma(2A/3)/2,3 \text{ RT}$	$1,77 \cdot 10^{-5}$	$1,77 \cdot 10^{-4}$	$1,77 \cdot 10^{-3}$	$1,77 \cdot 10^{-2}$	$1,77 \cdot 10^{-1}$	1,77
S./S _∞	1,0000	1,0004	1,004	1,04	1,5	5,69

3.1.8 Criterios para la elección del tamaño de grano de los cristales de KHT en las experiencias con siembra.

El tamaño de grano de los cristales de KHT empleado en la siembra, es un factor crítico en la precipitación del KHT. La elección del tamaño de grano de estos cristales debe responder a los siguientes criterios:

- No alterar apreciablemente la sobresaturación.
- Proporcionar una relación superficie/volumen máxima para la incorporación de los iones potasio y bitartrato disueltos en el vino.
- Facilitar esta incorporación reduciendo, en lo posible, el recorrido medio de los iones para llegar a esa superficie.
- En condiciones de convección forzada, esta debe ser efectiva (apartado 2.8.4) por lo que el tamaño de los cristales no debe ser menor de 5 μ m.
- El número y tamaño de los cristales debe ser tal que permitan una rápida separación de los mismos.

De entre todos estos aspectos, cristales muy pequeños proporcionan una alta relación superficie/volumen y un recorrido medio de los iones pequeño, mientras que cristales grandes no alteran apreciablemente la sobresaturación, y permitirán una agitación eficaz y una rápida separación. El tamaño de grano usado debe ser una solución de compromiso.

3.2 RELACION ENTRE LA CONDUCTIVIDAD ELECTRICA DE LAS SOLUCIONES HIDROALCOHOLICAS DE KHT Y DEL VINO CON LA CONCENTRACION DE POTASIO.

Una manera de conocer la concentración de los iones en solución, es medir la conductividad específica de la misma y establecer la

constante de proporcionalidad entre las dos variables. En numerosas experiencias de precipitación de KHT en soluciones hidroalcohólicas y en vinos se ha supuesto que la conductividad es una función lineal de la concentración (Koch y Schiller, 1964; Dunsford y Boulton, 1981 a y b; Colagrande y col., 1985; Maujean y col., 1984, 1985 y 1986).

Esta dependencia lineal no ha sido, en ningún caso, contrastada con medidas experimentales, por lo que nos hemos propuesto establecer la relación existente entre la conductividad y la concentración de potasio tanto en soluciones hidroalcohólicas como en vinos y determinar si en el intervalo de concentraciones de trabajo existe una dependencia lineal entre ambas variables.

3.2.1 Materiales y Métodos.

3.2.1.1 Muestras.

Se han utilizado soluciones hidroalcohólicas, con un contenido del 11% en alcohol preparadas por pesada, y vinos base para la elaboración de cavas procedentes del Penedès, con contenidos variables en KHT.

3.2.1.2 Medida de la conductividad.

Se ha medido con un conductímetro Crison modelo 525 con compensación automática de la temperatura.

3.2.1.3 Determinación de potasio.

Se ha realizado por Espectrofotometría de Absorción Atómica utilizando un equipo Perkin-Elmer modelo 2308.

3.2.1.4 Control de la temperatura.

Se ha utilizado un criostato Selecta modelo 382, con el que se consigue una precisión de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

3.2.2. Resultados y Discusión.

En las Tablas 3.7 y 3.8 se muestra la conductividad específica medida a 0°C de las soluciones hidroalcohólicas y vinos, junto a su concentración en potasio.

La relación entre la conductividad equivalente y la concentración viene dada por la ecuación de Kohlrausch:

$$\lambda_{eq} = A + B c^{1/2} \quad [3.13]$$

donde λ_{eq} es la conductividad equivalente, expresada en $\mu S \text{ eq}^{-1}$, c es la concentración de la solución expresada en miliequivalentes por litro y A y B son dos constantes para un electrolito dado en un disolvente determinado. Esta ecuación es aplicable a electrolitos débiles 1:1 en soluciones diluidas (Glasstone, 1953). En el caso del KHT, aún en soluciones diluidas, se deben tener en cuenta los efectos derivados de la hidrólisis del KHT y considerar la solución como una mezcla de ácido tartárico, ión bitartrato y ión tartrato.

Un ajuste por mínimos cuadrados de los datos de la Tabla 3.7, conduce a la ecuación:

$$\lambda_{eq} = 56,23 - 5,31 c^{1/2} \quad [3.14]$$

El término independiente de esta ecuación nos indica la conductividad equivalente límite, es decir, la conductividad del electrolito a dilución infinita, que a su vez es como suma de las conductividades iónicas del catión y del anión:

$$\lambda^{\circ} = \lambda_{+} + \lambda_{-} \quad [3.15]$$

En la bibliografía (Robinson y Stokes, 1955; Landolt-Bornstein, 1959) encontramos los datos relativos a las conductividades iónicas del ión potasio y del ión bitartrato a 25° C en solución acuosa:

$$\lambda_{K^{+}} = 73,5 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{eq}^{-1}$$

Tabla 3.7. Conductividad específica, X , y conductividad equivalente, λ_{eq} , en función de la concentración de potasio, en soluciones hidroalcohólicas de 11° alcohólicos a 0°C.

[K ⁺] mg/l	[K ⁺] meq/l	X $\mu S\ cm^{-1}$	λ_{eq} $Seq^{-1}cm^2$
552	14.15	527	37.24
486	12.46	479	38.44
447	11.46	432	37.69
409	10.49	408	38.89
373	9.56	370	38.70
268	6.90	301	43.62

Tabla 3.8. Conductividad específica, X , y conductividad equivalente, λ_{eq} , en función de la concentración de potasio en vinos a 0°C.

[K ⁺] mg/l	[K ⁺] meq/l	X $\mu S\ cm^{-1}$	λ_{eq} $Seq^{-1}cm^2$
618	15.84	802	50.63
552	14.15	762	53.85
481	12.33	708	57.40
428	10.97	659	60.07
373	9.56	649	67.89

$$\lambda_{\text{KHT}} = 31.0 \text{ } \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{eq}^{-1}$$

de donde la conductividad equivalente límite para el caso del KHT será:

$$\lambda_{\text{KHT}}^0 = 104,5 \text{ } \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{eq}^{-1} \text{ para una solución acuosa a } 25^\circ\text{C}.$$

Para calcular la conductividad equivalente límite del KHT en solución acuosa de 11° alcohólicos, podemos hacer uso de la regla de Walden que establece que el producto de la conductividad equivalente límite y la viscosidad del medio es constante para cualquier disolvente y temperatura.

Así, conociendo la viscosidad del agua a 25°C :

$$\eta_{25^\circ\text{C}} = 0.983 \text{ c.p.}$$

podemos aplicar la regla de Walden:

$$0.893 \times 104,5 = 93,31$$

Para poder calcular la conductividad equivalente, necesitamos conocer la viscosidad de la mezcla agua-alcohol a 0°C . En esta clase de mezclas, la viscosidad, η , sigue una ley del tipo (Perry-Chilton, 1974):

$$\log \eta = x_A \log \eta_A + x_B \log \eta_B \quad (3.16)$$

donde η_A y η_B son las viscosidades de los disolventes puros y x_A y x_B son las fracciones molares de los disolventes en la mezcla. Para conocer x_A y x_B debemos convertir el porcentaje en volumen de alcohol que viene dado por el grado alcohólico, en porcentaje en peso. Según Tomasset y Bossia (1978), la relación es la siguiente:

$$\% \text{ peso} = 0,79465 A + 0,000648 A^2 + 0,000007 A^3 \quad (3.17)$$

donde A es el grado alcohólico.

Para $A = 11$, grado alcohólico de estas soluciones, el porcentaje en peso de etanol es de 8,83 y las fracciones molares serán:

nº de moles de etanol = $8,83/46 = 0,19$

nº de moles de agua = $91,17/18 = 5,07$

$$x_{\text{etanol}} = 0.04$$

$$x_{\text{H}_2\text{O}} = 0.96$$

y aplicando la ecuación 3.16 obtenemos un valor de la viscosidad para una solución hidroalcohólica de 11° de alcohol a 0°C de 1,786 c.p..

Aplicando ahora la regla de Walden:

$$\lambda^{\circ}_{\text{corr. o-c}} = 52,5 \mu\text{Scm}^2 \text{eq}^{-1}$$

que es la conductividad equivalente límite para el KHT en una solución de 11° alcohólicos a 0°C de temperatura y comparando este valor con el obtenido experimentalmente:

$$\lambda^{\circ}_{\text{exp}} = 56,2 \mu\text{Scm}^2 \text{eq}^{-1}$$

vemos que la diferencia no es muy grande y pueda ser explicada por los efectos de la hidrólisis del ión bitartrato así como por los límites de aplicación de la regla de Walden, que exige al electrolito estar completamente disociado y no variar de volumen con el disolvente. La hidrólisis del ión bitartrato, no se hace notar en exceso debido probablemente a que, al pH de trabajo, se encuentra como componente mayoritario.

En el caso del vino, podemos buscar una relación similar a la obtenida para la solución sintética. Con los valores de la Tabla 3.8 y por un ajuste por mínimos cuadrados, obtenemos la ecuación siguiente:

$$\lambda_{\text{eq}} = 122,25 - 18,21 c^{1/2} \quad [3.18]$$

La conductividad equivalente límite, mayor que en el caso de la solución hidroalcohólica, se debe a la contribución del resto de los iones presentes en el vino.

Estas ecuaciones tienen interés teórico para comparar los resultados experimentales con los valores encontrados en la bibliografía, pero es más práctica una ecuación que relacione la conductividad específica, X , con la concentración, del tipo:

$$X = b + m c \quad (3.19)$$

donde b y m son constantes.

Para esto, conociendo la relación entre la conductividad equivalente y la conductividad específica, deberíamos resolver la ecuación:

$$X/c = A + B c^{1/2} \quad (3.20)$$

o:

$$X = A c + B c^{3/2} \quad (3.21)$$

Vemos que la relación entre la conductividad específica y la concentración no es sencilla. Para obviar esta incómoda dependencia, se puede recurrir a un desarrollo en serie de Taylor y expresar la conductividad específica como función lineal de la concentración, despreciando la contribución de los términos de segundo orden y superiores, comparando la ecuación obtenida para los límites superior e inferior del rango de concentraciones utilizados con un ajuste por mínimos cuadrados de los resultados experimentales.

Así, a partir de la ecuación 3.14, obtenemos para el caso de la solución hidroalcohólica:

$$X = 56,23 c - 5,31 c^{3/2} \quad (3.22)$$

y haciendo uso del desarrollo en serie de Taylor:

$$X(a) = f(a) + f'(a) (c - a) \quad (3.23)$$

para el rango de concentraciones utilizado, Tabla 3.8, en el caso de la solución:

$$X(6) = 39,02 + 36,72 c \quad [3.24]$$

y

$$X(14) = 139,06 + 26,42 c \quad [3.25]$$

la adaptación de los datos experimentales, al caso de la solución hidroalcohólica, nos da una recta:

$$X = 72,07 + 31,86 c \quad [3.26]$$

con un coeficiente de regresión $r = 0,993$.

En el caso del vino, a partir de la ecuación 3.18, obtenemos:

$$X = 122,25 c + 18,21 c^{3/2} \quad [3.27]$$

que, haciendo un desarrollo en serie de Taylor para el rango de concentraciones utilizado:

$$X(9) = 245,83 + 40,30 c \quad [3.28]$$

y

$$X(16) = 582,72 + 12,99 c \quad [3.29]$$

mientras que la adaptación de los datos experimentales conduce a la ecuación siguiente:

$$X = 388,09 + 26,09 c \quad [3.30]$$

con un coeficiente de correlación $r = 0,992$.

Por tanto la relación entre la conductividad específica y la concentración de potasio es lineal, con un coeficiente de correlación mayor, en todos los casos que 0,99, lo que permite suponer una dependencia directa entre las dos variables en el rango de concentraciones de trabajo.

3.3 CONCLUSIONES.

La sobresaturación en KHT del vino se puede conocer de una manera aceptable a través de los datos analíticos siguientes: grado

alcohólico, pH, concentración de ión potasio y concentración de ión bitartrato, evaluando el efecto de los iones ajenos a los precipitantes a través de la fuerza iónica del medio.

El tamaño de grano de los cristales de KHT utilizado en la operación de siembra no debe ser menor a 5 μm ., para no alterar la solubilidad y permitir una agitación eficaz.

La medida de la conductividad es un indicador fiable de la concentración del ión potasio en soluciones hidroalcohólicas y vinos y puede utilizarse para seguir el desarrollo de la precipitación del KHT.

CAPITULO 4.

ESTUDIO DE LA PRECIPITACION DEL BITARTRATO POTASICO Y MORFOLOGIA DE LOS CRISTALES, EN SOLUCIONES HIDROALCOHOLICAS Y EN VINOS.

RESUMEN.

En este capítulo se estudia la precipitación del bitartrato potásico (KHT) en soluciones hidroalcohólicas y vinos según los mecanismos de nucleación homogénea y secundaria explicados en el Capítulo 2, midiendo en continuo la conductividad específica. Se discute la cinética de precipitación, la composición del precipitado y la temperatura de saturación. Se estudia la morfología de los cristales de KHT crecidos en soluciones hidroalcohólicas y en vinos, se analiza el papel desempeñado por las impurezas y se propone un mecanismo de crecimiento del KHT en vinos.

4.1 INTRODUCCION.

Las primeras experiencias sobre la precipitación del KHT fueron realizadas en 1964 por Koch y Schiller sobre soluciones hidroalcohólicas. Estos autores calcularon las constantes de velocidad de los momentos iniciales de la reacción de precipitación del KHT a través de un mecanismo de nucleación homogénea suponiendo que tenía lugar a través de una cinética de primer orden.

Los estudios sobre la precipitación del KHT en vinos son numerosos y han sido revisados en el capítulo 1. No existen, en cambio, estudios cinéticos de la precipitación del KHT en vinos, según un mecanismo de nucleación homogénea.

La comparación de la cinética de precipitación del KHT en los dos medios: soluciones hidroalcohólicas y vinos, así como el estudio de

la influencia que sobre la misma puedan tener parámetros experimentales tan decisivos en este tipo de experiencias como la agitación o la sobresaturación puede aportar datos que permitan discernir el mecanismo de nucleación y crecimiento de la cinética de precipitación del KHT.

Entre los procedimientos más recientes para la extracción del KHT de los vinos, abundan los que inducen la precipitación del KHT, mediante la siembra de cristales, a través de un mecanismo de nucleación secundaria. Estos mecanismos pretenden convertir la práctica de estabilización de vinos en una operación continua o, al menos, semicontinua reduciendo el largo tiempo de inmovilización del vino cuando se realiza la estabilización tradicional.

Los estudios cinéticos sobre la precipitación del KHT en vinos, se limitan a los realizados, con siembra de cristales de KHT, por Dunsford y Boulton (1981 a y b). El resto de los autores que han trabajado sobre el tema, se limitan a hacer medidas empíricas del descenso en la concentración de los iones, encaminadas a evaluar, únicamente, el rendimiento de la precipitación y la efectividad de los tratamientos. Los resultados, siendo esperanzadores, no han resuelto completamente el problema, ya que se ha encontrado una notable variación en cuanto al rendimiento de la precipitación y la estabilidad del vino tratado dependiendo del tipo de vino; por ahora, es imprescindible realizar operaciones de tanteo para optimizar cualquier método.

Las experiencias realizadas y que se resumen en este capítulo, comprenden el estudio cinético de la precipitación del KHT, sin siembra, a partir de soluciones hidroalcohólicas y de vinos blancos

base para la elaboración de cavas de la comarca vitivinícola del Penedés. Las experiencias se han realizado a temperatura constante, sobresaturación inicial conocida y agitación controlada, con medida en continuo de la conductividad. El objeto de estos ensayos es comparar los resultados de los tiempos de inducción, cinéticas de nucleación y crecimiento del KHT en los dos sistemas de trabajo.

A la vista de estos resultados, y ante la ausencia de estudios sistemáticos realizados sobre la precipitación del KHT, con siembra en vinos base para la elaboración de cavas, se ha estudiado la influencia de la temperatura de tratamiento, la cantidad de siembra utilizada y la velocidad de agitación, sobre la precipitación del KHT en este tipo de vinos.

Las temperaturas de tratamiento estudiadas han sido de 0°C y -4°C, que son las habituales de la estabilización tradicional y garantizan una sobresaturación suficiente.

La cantidad de siembra que se encuentra con más frecuencia en la bibliografía es de 4 gr/l, que ha sido empleada por nosotros junto con una siembra mayor, 8 gr/l, para ver si aumentaba el rendimiento de la precipitación.

Las velocidades de agitación escogidas han sido de 100 y 400 rpm.

En todos los casos, el seguimiento de las diferentes etapas de la precipitación se ha hecho midiendo en continuo la conductividad de las soluciones, que como se ha visto en el capítulo 3.2 es un indicador fiable de la concentración de soluto en la solución.

4.2 MATERIAL Y METODOS.

4.2.1 Muestras.

Soluciones hidroalcohólicas de 11° alcohólicos preparadas por pesada, conteniendo cantidades variables de KHT.

Vinos base para la elaboración de espumosos, mezcla de las tres variedades de uva blanca: Xarello, Macabeo y Parellada, procedentes del Penedés y correspondientes a la vendimia de 1985.

Los vinos utilizados en las experiencias de nucleación homogénea, sin siembra de cristales de KHT, presentaron los parámetros analíticos siguientes: grado alcohólico 10,75°; acidez total 6,08 g/l (ác. tartárico); Acidez volátil 0,29 g/l (ác. acético); azúcares reductores 0,82 g/l.

Los vinos empleados en las experiencias de nucleación secundaria, con siembra de cristales de KHT, presentaron los parámetros analíticos siguientes: grado alcohólico 11,00°; acidez total 5,84 g/l (ác. tartárico); acidez volátil 0,37 g/l (ác. acético); azúcares reductores 0,91 g/l.

4.2.2 Medida de la conductividad.

Ha sido descrito en el apartado 3.2.1.2. El valor de la conductividad se ha registrado en continuo mediante un registrador J.J. Recorder CE500 acoplado al conductímetro.

4.2.3 Control de temperatura.

Ha sido descrito en el apartado 3.2.1.4.

4.2.4 Determinación de la concentración de potasio.

Ha sido descrito en el apartado 3.2.1.3.

4.2.5 Determinación de la concentración de ión bitartrato.

La concentración de ión bitartrato se ha determinado, en el caso de las soluciones, por valoración ácido-base con NaOH 0,1 N utilizando fenolftaleína como indicador; en el caso de los vinos, la concentración de ión bitartrato se ha determinado midiendo la concentración del ión tartrato según Vidal y Blouin (1978), y conociendo el grado de ionización del mismo en función del pH y grado alcohólico (Tabla 3.3).

4.2.6 Medida del pH.

El pH de las soluciones se ha medido con un pH-metro digital Crison modelo 517.

4.2.7 Agitación.

Para la agitación se han usado agitadores Heidolph provistos de un sistema de cuentarrevoluciones digital. En el caso de las soluciones hidroalcohólicas se han utilizado dos sistemas de agitación: un agitador vertical consistente en una pala plana de teflón en forma de segmento circular suspendida en seno de la solución y un agitador magnético consistente en una barra magnética situada en el fondo del matraz.

4.2.8 Descripción del dispositivo experimental.

El recipiente utilizado para realizar las experiencias, ha sido un matraz encamisado con tres bocas por donde se introduce el agitador y las sondas de conductividad y temperatura.

Las soluciones recién preparadas y filtradas por una membrana de tamaño de poro de 0.45 μ , para asegurar la ausencia de gérmenes, se enfriaron a 0°C. Durante la refrigeración, que se realizó deliberadamente muy despacio y sin agitación, se midió la

conductividad compensada para comprobar la ausencia de nucleación y el mantenimiento de la concentración inicial de KHT.

Los vinos se filtraron a través de una membrana del mismo tamaño de poro, 0,45 μ , y se enfriaron de la misma manera que las soluciones.

4.2.9 KHT utilizado para la siembra.

El KHT añadido al vino, empleado en las experiencias con siembra, ha sido de la casa Merck referencia 4892, y su tamaño de grano se ha medido con un aparato Sedigraf (Micrometrics U.S.A.), encontrando como resultado que el 85 % de los cristales tienen un tamaño comprendido entre 30 y 70 μ m.

4.2.10 Difracción de Rayos X.

Para el análisis por difracción de Rayos X de los cristales de KHT se ha usado un difractómetro Phillips modelo PW 1771/00 con tubo de cobre y una unidad de control modelo PW 1710/00.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSION.

4.3.1 Estudio de la precipitación del KHT en soluciones hidroalcohólicas y en vinos, sin siembra.

4.3.1.1 Precipitación a partir de soluciones hidroalcohólicas.

a) Influencia de la agitación.

En las experiencias de precipitación sin agitación, el descenso de la conductividad frente al tiempo ha sido lineal. En estas condiciones experimentales, no se ha podido detectar periodo de inducción lo que significa que cuando la precipitación comienza lo hace muy lentamente.

Estos resultados nos hacen suponer la simultaneidad de la nucleación heterogénea sobre las paredes del recipiente o las impurezas presentes y el crecimiento de los gérmenes supercríticos formados.

Las Figuras 4.1 y 4.2 recogen las variaciones de la conductividad frente al tiempo en las experiencias realizadas con el agitador vertical y la Figura 4.3 las experiencias realizadas con agitación mediante agitador magnético.

La primera observación que se desprende de estas experiencias es la influencia determinante del sistema de agitación en la precipitación. En las experiencias realizadas con pala de teflón no se ha podido detectar período de inducción.

El perfil de las tres curvas, se pueden hacer corresponder con las siguientes etapas de una curva modelo:

1ª etapa: Al comienzo de la agitación, sea cual sea el sistema empleado, se produce un aumento instantáneo de la conductividad, que no se aprecia en las figuras, que vuelve rápidamente a su valor inicial, atribuible a la homogeneización de la temperatura causada por la agitación.

2ª etapa: Le sigue un brusco descenso de la conductividad causado por el primer episodio de nucleación tridimensional y el crecimiento cristalino.

3ª etapa: A continuación sigue un período en el que la conductividad desciende más lentamente pudiendo incluso llegar a estabilizarse y que se relaciona con un proceso mixto de descenso de la velocidad de nucleación tridimensional y el crecimiento de

los núcleos formados junto a fenómenos de envejecimiento de Ostwald.

4ª etapa: Después sucede un descenso más suave de la conductividad, que se relaciona con los episodios de crecimiento cristalino, pudiendo participar también fenómenos de nucleación secundaria.

En el caso de la sobresaturación $\beta = 1,14$ y utilizando como sistema de agitación una pala de teflón suspendida en el seno de la solución, Figura 4.1, se pueden hacer las siguientes consideraciones particulares:

- 1) no se pueda evaluar el tiempo de inducción más que para $w = 100$ r.p.m..
- 2) Para $w = 300$ y 400 r.p.m., el descenso inicial de la conductividad, etapa 2ª de la curva modelo, es claramente mayor que para 100 y 200 r.p.m. lo que indica una gran dependencia del primer episodio de la nucleación con la agitación.
- 3) Para $w = 100$ r.p.m. la disminución de la conductividad es menos pronunciada pero de mayor duración que para $w = 200$ r.p.m.. Para agitaciones superiores, la pendiente es menor. Esto podría indicar que a medida que aumentamos la agitación, la mayor disminución inicial de la sobresaturación hace que el proceso de envejecimiento comience antes y con mayor intensidad.
- 4) La redisolución de los núcleos subcríticos, etapa 3ª de la curva modelo, es tanto más pronunciada cuanto más débil es la agitación. Para el caso de $w = 100$ r.p.m., la redisolución de los núcleos formados, compensa el crecimiento de los núcleos

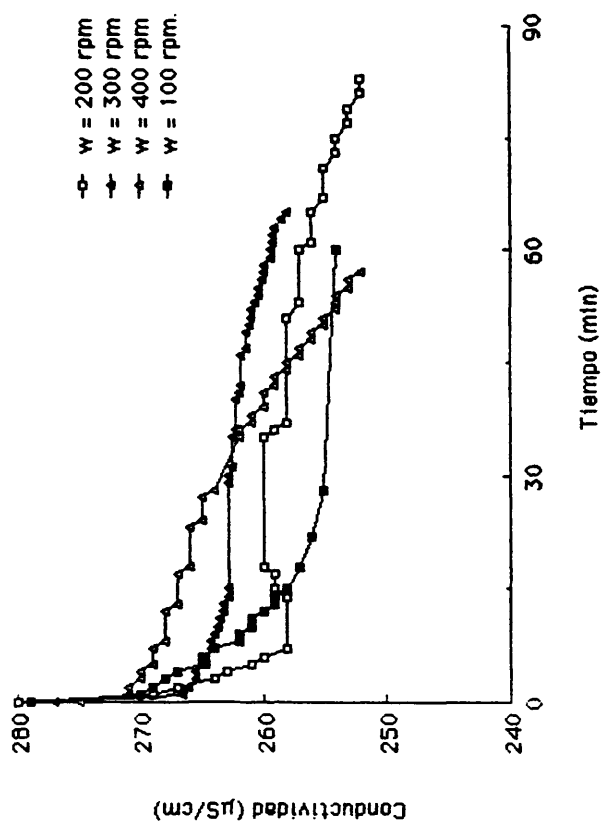


Figura 4.1. Variación de la conductividad específica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) frente al tiempo en las experiencias de precipitación del KHT en soluciones hidroalcohólicas a 0°C , a distintas velocidades de agitación. Sobresaturación (C/C_{eq}) = 1,14. Agitador vertical.

supercríticos como muestra la estabilización observada en la conductividad.

5) El siguiente descenso en la conductividad, 4ª etapa de la curva modelo, parece ser de pendiente proporcional a la agitación.

La simultaneidad de los distintos fenómenos no permite un análisis cuantitativo de los mismos por separado.

Para una sobresaturación mayor, $\beta = 1.42$, Figura 4.2, y utilizando también como sistema de agitación la pala de teflón, se pueden hacer las siguientes observaciones:

- 1) No existe período de inducción más que para el caso de $w = 100$ r.p.m..
- 2) Una vez que comienza el descenso de la conductividad, solo se estabiliza para $w = 100$ r.p.m. y la duración de este período de estabilidad es menor que para la sobresaturación anterior. Esto indica que a esta sobresaturación, el fenómeno de redisolución no es mayoritario.
- 3) Se pueden apreciar diversos tramos con pendientes decrecientes.
- 4) La pendiente final es del mismo orden de magnitud en todos los casos.

En las experiencias realizadas con una sobresaturación $\beta = 2.11$ y usando como sistema de agitación un agitador magnético (Figura 4.3), cabe hacer las siguientes consideraciones:

- 1) Existe un período de inducción donde la conductividad es más o menos constante a todas las agitaciones empleadas. Se observa una dependencia entre la duración de este período y la agitación.

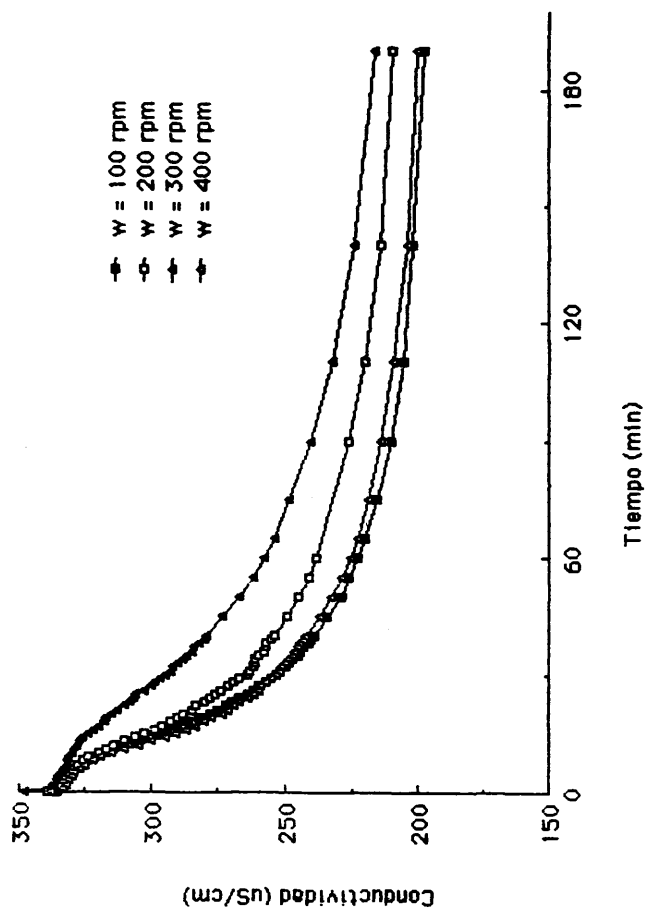


Figura 4.2. Variación de la conductividad específica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) frente al tiempo en las experiencias de precipitación del KHF en soluciones hidroalcohólicas a 0°C , a distintas velocidades de agitación. Sobre saturación (C/C_{eq}) = 1.42. Agitador vertical.

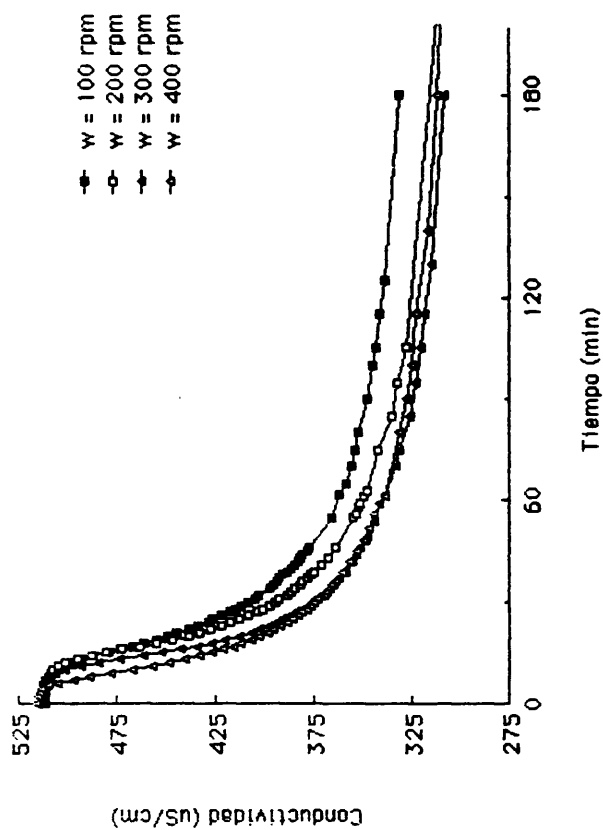


Figura 4.3. Variación de la conductividad específica ($\mu\text{S/cm}$) frente al tiempo en las experiencias de precipitación del KHT en soluciones hidroalcohólicas a 0°C , a distintas velocidades de agitación. Sobre saturación (C/C_{eq}) = 2,11. Agitador magnético.

2) El descenso de la sobresaturación es menos pronunciado que cuando la agitación se realiza con pala de teflón. Este hecho junto con la existencia de período de inducción, hace posible una uniformidad en el tamaño de grano que minimiza el fenómeno de redisolución.

3) Existe un período en el que la conductividad desciende rápidamente con el tiempo lo que también se atribuye a fenómenos de nucleación y crecimiento.

4) En el trayecto final de la curva, la conductividad disminuye muy lentamente con el tiempo lo que se relaciona con fenómenos de crecimiento de los núcleos ya formados, y las pendientes son del mismo orden de magnitud e independientes de la agitación.

Ya se ha discutido en el apartado 3.8.4, la interdependencia existente entre la agitación y el tamaño de grano, por lo que cabría esperar poca influencia de la agitación en los primeros estadios de la nucleación (cuando los núcleos son más pequeños). Sin embargo, la diferencia entre la disminución de concentración observada en los dos sistemas de agitación y la distinta velocidad empleada para cada caso, permite concluir que al aumentar la agitación, aumenta la velocidad de nucleación. Este aumento en la velocidad de nucleación debe explicarse por el mayor número de núcleos que origina la agitación.

b) Influencia de la sobresaturación.

En las mismas condiciones de temperatura, 0° C, y agitación, 100 r.p.m. se han realizado experiencias encaminadas a estudiar la dependencia de la nucleación con la sobresaturación en soluciones hidroalcohólicas. Se han ensayado cuatro valores distintos para la

sobresaturación: 2.00, 1.82, 1.64, 1.45, correspondientes a 550, 500, 450 y 400 ppm de potasio respectivamente. En todos los casos se ha utilizado como sistema de agitación un agitador magnético.

Las Figuras 4.4 y 4.5 representan la disminución de la conductividad frente al tiempo, en las distintas experiencias registradas.

El perfil de la curva de la conductividad frente al tiempo se corresponde con el descrito anteriormente para el caso de las precipitaciones usando un agitador magnético. Se pueden destacar los siguientes resultados:

- 1) Se observa una clara dependencia del período de inducción con la sobresaturación.
- 2) La pendiente de las curvas aumenta al aumentar la sobresaturación.

La dependencia del período de inducción con la sobresaturación puede ser utilizada para evaluar la energía libre de superficie (Nielsen y Söhnel, 1971). Según estos autores, la representación de $\log \tau$ frente a $(\log \beta)^{-2}$ debe ser una recta de pendiente α_s , relacionada con la energía libre de superficie, γ , mediante la ecuación:

$$\tau = KT (1/\alpha) (5 \alpha_s / 64 Q^2)^{1/2} \quad [4.1]$$

donde K es la constante de Boltzman ($1.38 \cdot 10^{-23}$ J/°K)

T y Q tienen el mismo significado que en los apartados anteriores, es decir, la temperatura absoluta y el volumen molar respectivamente.

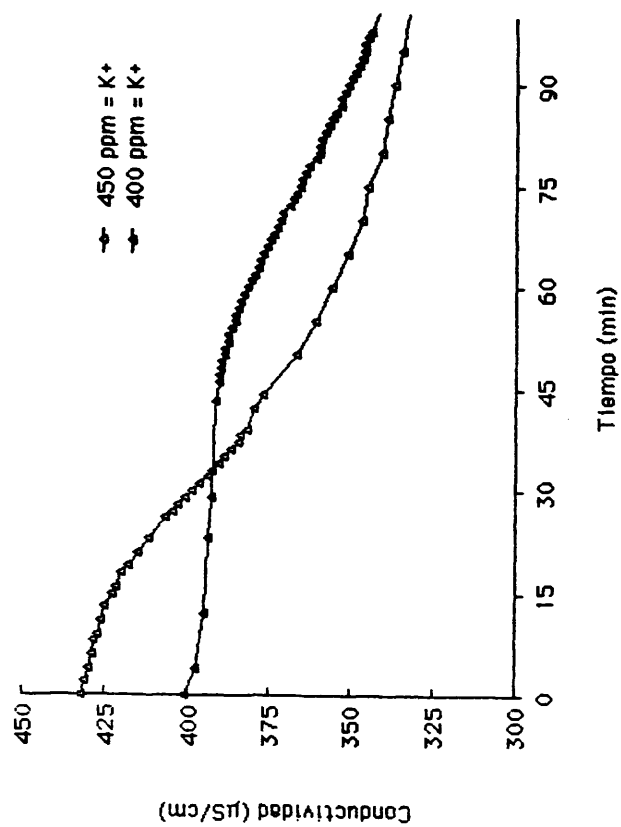


Figura 4.4. Variación de la conductividad específica ($\mu\text{S/cm}$) frente al tiempo en las experiencias de precipitación del KHT en soluciones hidroalcohólicas a 0°C , a distintas concentraciones iniciales de KHT. Agitador magnético.

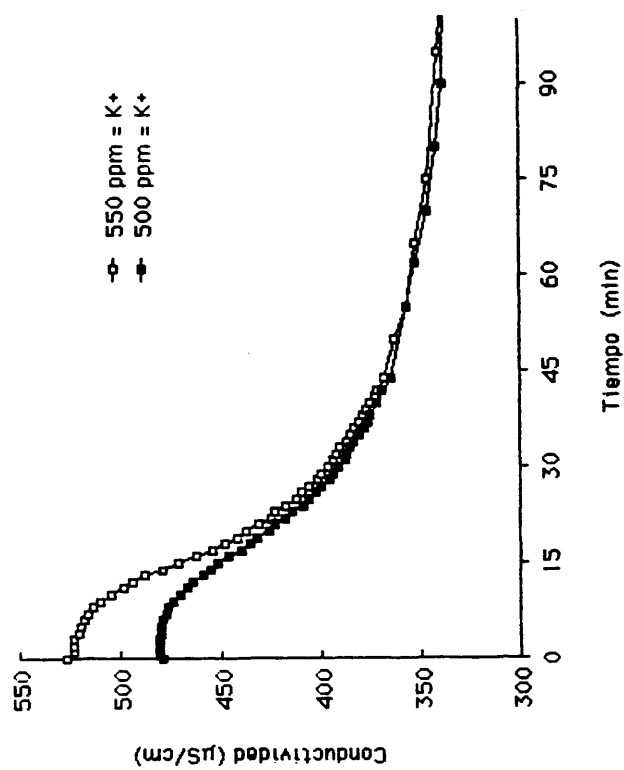


Figura 4.5. Variación de la conductividad específica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) frente al tiempo en las experiencias de precipitación del KHT en soluciones hidroalcohólicas a 0°C , a distintas concentraciones iniciales de KHT. Agitador magnético.

Esta ecuación es válida para el caso de un núcleo cúbico y las diferencias para otras formas son pequeñas excepto para casos de cristales dendríticos, lo que no ocurre en el KHT.

De las Figuras 4.4 y 4.5 se obtienen los valores de los tiempos de inducción (Tabla 4.1). Un ajuste por mínimos cuadrados conduce a la ecuación:

$$\log \tau = 2,3885 + 0.0257 (\log \beta)^{-2} \quad [4.2]$$

con un coeficiente de regresión de 0.9997. La bondad de este ajuste permite asegurar (Kirchova y col. 1978) que el mecanismo de nucleación es el mismo en el rango de sobresaturaciones empleado y calcular la energía libre de superficie, γ , a través de la ecuación [4.1]. El valor obtenido para la energía libre de superficie ha sido de 0.0089 J/m².

Tabla 4.1. Variación del tiempo de inducción, τ , con la sobresaturación, β , en soluciones de 11° alcohólicos, a 0°C.

[K-] mg/l	β	τ seg
550	2.00	480
500	1.82	582
450	1.64	854
400	1.45	2400

4.3.1.2 Precipitación del KHT en vinos.

Se han realizado experiencias de precipitación con vinos, con cuatro agitaciones distintas: 100, 200, 300 y 400 r.p.m., efectuadas con un agitador magnético. Un sistema de agitación más intenso, como el de la pala de teflón utilizado en soluciones podría ser más eficaz pero no hay que olvidar el riesgo de oxidaciones a las que el vino blanco es muy sensible.

El descenso de conductividad se muestra en la Figura 4.6.

Estudiando el perfil de la curva se nota gran similitud cualitativa con las obtenidas a partir de soluciones hidroalcohólicas con el mismo sistema de agitación. Sin embargo, cabe destacar notables diferencias cuantitativas:

- 1) Los periodos de inducción son considerablemente más largos y parecen depender de la agitación. Se observa un aumento en el periodo de inducción cuando se pasa de $w = 300$ r.p.m. a $w = 400$ r.p.m.
- 2) La disminución de la conductividad frente al tiempo, es notablemente más lenta.

El hecho más sorprendente es el aumento en el periodo de inducción al aumentar la agitación. Esto nos indica que una agitación excesiva puede actuar negativamente sobre la estructura del vino aumentando su capacidad para acomplejar los iones precipitantes, o bien que los fenómenos de inhibición se dejan notar con más intensidad cuando se aumenta la agitación.

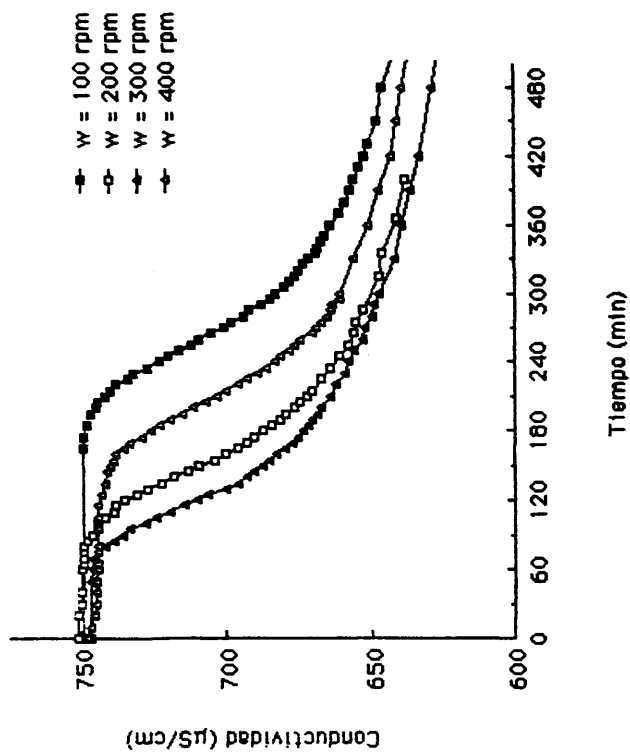


Figura 4.6. Variación de la conductividad específica ($\mu\text{S/cm}$) frente al tiempo en las experiencias de precipitación del KHT en vinosa, sin siembra de cristales a 0°C , a distintas velocidades de agitación. Agitador magnético.

4.3.1.3. Cinética de la precipitación.

Con vistas a determinar el orden y la constante de velocidad de la reacción de precipitación se han efectuado los test de verificación de cinéticas de primer y segundo orden, descritos en el apartado 2.7, en todas las experiencias realizadas. Al no existir una diferencia indiscutible en favor de alguno de los dos casos y al haber observado una clara incidencia de la agitación sobre la velocidad de disminución de la concentración de soluto, se ha optado, con vistas a obtener un modelo interpretativo uniforme, por una cinética de primer orden controlada por el transporte de soluto.

Una dependencia lineal de la conductividad, y por tanto de la concentración, con el tiempo responde, según Nielsen (1981) a un mecanismo de crecimiento controlado por el transporte, donde la velocidad es proporcional a la sobresaturación y a un factor dependiente de la forma y del tamaño del cristal, o bien a un mecanismo de crecimiento controlado por reacciones de integración en la superficie con una constante de velocidad también proporcional a la sobresaturación.

La Tabla 4.2 recoge las constantes de velocidad de la reacción de precipitación del KHT, a 0°C, en soluciones hidroalcohólicas, supuesta una cinética de primer orden, junto con el período de inducción, τ , y el descenso inicial de la conductividad, ΔL . En la Tabla 4.3 se muestra el período de inducción y el valor de la constante de la reacción de precipitación del KHT a 0°C en vinos. En todos los casos se pueden apreciar que las constantes de velocidad para los distintos intervalos de tiempo van disminuyendo a medida que avanza la reacción de precipitación y la sobresaturación residual disminuye.

Tabla 4.2. Período de inducción, τ , descenso inicial de la conductividad, ΔX_0 , y constantes de velocidad, K, de la reacción de precipitación del KHT, obtenidos a 0°C en soluciones hidroalcohólicas y con distintas velocidades de agitación.

a) Sobresaturación $\beta = 1.14$, agitador vertical.				
	τ min	ΔX_0 μScm^{-1}	Intervalo min	K min^{-1}
sin agitación	-	-	-	$1.05 \cdot 10^{-4}$
100 rpm	0.3	-	2 - 8 18 - 60	0.0933 0.0033
200 rpm	0.1	8	0.2- 7 36 - 60	0.1125 0.0038
300 rpm	0.1	11	0.1- 10 35 - 60	0.0291 0.0100
400 rpm	0.1	4	0.1- 10 10 - 60	cambio continuo de K 0.0444
b) Sobresaturación $\beta = 1.42$, agitador vertical.				
	τ min	ΔX_0 μScm^{-1}	Intervalo min	K min^{-1}
sin agitación	-	-	-	$1.62 \cdot 10^{-4}$
100 rpm	0.3	-	6 - 12 35 - 60	0.2120 0.0086
200 rpm	0.1	5	3 - 13 13 - 60	0.1745 0.0085
300 rpm	0.1	9	4 - 30 40 - 60	0.0569 0.0123
400 rpm	0.1	6	4 - 14 32 - 60	0.0954 0.0091

Tabla 4.2. continuación.

c) Sobresaturación $\beta = 2.11$, agitador magnético.				
	τ min	ΔX_0 μScm^{-1}	Intervalo min	K min^{-1}
100 rpm	7	-	7 - 15	0.3000
			55 - 90	0.0040
200 rpm	8	-	8 - 15	0.3986
			55 - 90	0.0035
300 rpm	7	-	7 - 14	0.3714
			45 - 85	0.0040
400 rpm	8	-	8 - 16	0.5520
			20 - 35	0.0032

Tabla 4.3. Período de inducción, τ , y constantes de velocidad, K , de la reacción de precipitación del KHT, obtenidos a 0°C en vinos, a distintas velocidades de agitación.

	τ min	Intervalo min	K min ⁻¹
sin agitación	-	-	6,72 10 ⁻⁶
100 rpm	212	230 - 335	0,00797
		335 - 720	0,00478
200 rpm	106	120 - 205	0,00914
		225 - 315	0,00599
300 rpm	82	100 - 165	0,00945
		175 - 300	0,00557
400 rpm	157	175 - 280	0,00733
		285 - 720	0,00295

Las diferentes pendientes observadas y la influencia determinante de la agitación hacen pensar (Nielsen, 1982) en un mecanismo gobernado por el transporte de las unidades de crecimiento hasta el cristal, y justifica la elección de una cinética de primer orden para el cálculo de las constantes de velocidad de la reacción de precipitación.

En el caso de soluciones hidroalcohólicas a intensa agitación, producida con una pala de teflón, la simultaneidad de distintos fenómenos: nucleación homogénea y heterogénea, envejecimiento de Ostwald, nucleación secundaria y crecimiento cristalino, hace difícil calcular el verdadero valor de la constante de velocidad en los primeros momentos de la nucleación.

Los valores de las constantes de reacción para los episodios finales de crecimiento, son independientes del sistema de agitación utilizado, lo que no ocurre con los tiempos de inducción y las constantes características de los episodios iniciales de la nucleación. Los episodios de crecimiento cristalino están controlados por el transporte de las unidades de crecimiento a la superficie del cristal, y su constante de velocidad incluye un factor de superficie que desconocemos. Este valor se puede considerar característico del proceso, ya que en los episodios finales se puede suponer una población de tamaño bastante uniforme.

La diferencia entre los dos tipos de agitación empleadas, sugiere que la agitación magnética, permite un transporte eficaz del soluto hacia las caras de los cristales ya formados, pero apenas favorece el episodio catastrófico de la nucleación.

Dunsford y Boulton (1981 a y b), en experiencias de precipitación de KHT en vinos, proponen el paso de una cinética de primer orden a

una de segundo orden pasados los momentos iniciales de la precipitación. Estos autores han trabajado siempre con siembra de cristales, recristalizados en la mayor parte de los casos, y por tanto en condiciones de nucleación secundaria, por lo que no debe extrañar el haber encontrado una cinética de primer orden en nuestras condiciones, donde el episodio predominante es la nucleación.

4.3.1.4. Estequiometría de la precipitación.

Los resultados de los análisis efectuados a las soluciones hidroalcohólicas y a los vinos se muestran en las Tablas 4.4 y 4.5. Se observa que la cantidad precipitada a partir de soluciones es prácticamente estequiométrica, mientras que no ocurre lo mismo en los vinos. En este caso, la cantidad de potasio que precipita es superior a la de bitartato. Esto implica la precipitación conjunta del KHT con otras sustancias, cargadas negativamente, dada la necesidad de mantener la electroneutralidad en el cristal. Resultados similares han sido encontrados por Piloni y Berg (1965), en experiencias de precipitación del KHT en vinos sin agitación. La precipitación no estequiométrica también ha sido puesta de manifiesto cuando se utilizan otras técnicas de estabilización tartárica de los vinos (Vucherpfenning, 1978, Troost, 1985).

Tabla 4.4. Relación entre la concentración de K^+ y de HT^- precipitado en experiencias de precipitación en soluciones hidroalcohólicas a distintas velocidades de agitación, w , y distintas sobresaturaciones.

a) Sobresaturación $\beta = 1.14$. $[KHT]_0 = 1.43$ g/l, agitador vertical.							
w rpm	pH	$[HT^-]$ meq/l	$\Delta[HT^-]$ meq/l	$[K^+]$ mg/l	$\Delta[K^+]$ meq/l	$\Delta[K^+]/\Delta[HT^-]$	
Sol. inicial	3.89	7.62	-	316	-	-	-
Sol. tratada 0	3.89	7.34	0.27	300	0.41	1.52	
Sol. tratada 100	3.90	6.59	1.03	275	1.05	1.05	
Sol. tratada 200	3.90	6.75	0.87	282	0.87	1.00	
Sol. tratada 300	3.89	7.02	0.60	291	0.64	1.07	
Sol. tratada 400	3.90	6.54	1.08	273	1.10	1.02	

Tabla 4.4 (continuación)

b) Sobresaturación $\beta = 1.42$. $(KH)_0 = 1.78$ g/l, agitador vertical.									
w	pH	$[HT^-]$	$\Delta[HT^-]$	$[K^+]$	$\Delta[K^+]$	$\Delta[K^+]/\Delta[HT^-]$			
rpa		meq/l	meq/l	mg/l	meq/l				
Sol. inicial	3.88	9.49	-	388	-	-			
Sol. tratada 0	3.90	6.51	2.98	257	3.36	1.13			
Sol. tratada 100	3.93	5.05	4.44	207	4.64	1.05			
Sol. tratada 200	3.92	5.16	4.93	199	4.85	0.96			
Sol. tratada 300	3.93	5.48	4.01	223	4.23	1.05			
Sol. tratada 400	3.94	5.05	4.44	199	4.85	1.09			

Tabla 4.4 (continuación)

c) Sobresaturación $\beta = 2.11$. $[KHT]_0 = 2.04$ g/l, agitador magnético.									
	ω rpm	pH	$[HT^-]$ meq/l	$\Delta[HT^-]$ meq/l	$[K^+]$ mg/l	$\Delta[K^+]$ meq/l	$\Delta[K^+]/\Delta[HT^-]$		
Sol. inicial	-	3.63	13.09	-	540	-	-		
Sol. tratada	100	3.64	7.50	5.59	330	5.36	0.96		
Sol. tratada	200	3.64	9.04	4.05	379	4.13	1.02		
Sol. tratada	300	3.64	9.26	3.83	390	3.85	1.01		
Sol. tratada	400	3.64	9.47	3.62	390	3.85	1.06		

Tabla 4.5. Relación entre la concentración (mg/l) de K. y de HT-
precipitado en experiencias de precipitación en vinos a
distintas velocidades de agitación, w.

	w	pH (H ₂ T)	%HT-	(HT-)	Δ(HT-)	(K*)	Δ(K*)	Δ(K*)/Δ(HT-)
Vino inicial	-	3.04	25.9	49.1	12.73	-	14.5	-
Vino tratado	100	2.97	22.2	45.5	10.13	2.0	9.4	5.1
Vino tratado	200	2.98	21.4	46.0	9.84	2.9	9.9	4.0
Vino tratado	300	2.98	22.2	46.0	10.24	2.5	9.6	4.7
Vino tratado	400	2.98	23.9	46.0	11.01	1.7	11.3	3.2
								1.87

4.3.2 Estudio de la precipitación del KRT de los vinos con siembra.

4.3.2.1 Rendimiento de la precipitación.

Las Figuras 4.7 y 4.8, recogen la variación de la conductividad frente al tiempo en las distintas experiencias realizadas.

Los valores de la disminución de la conductividad en los diez primeros minutos, en la primera hora y entre los 60 y 70 minutos, se muestran en la Tabla 4.6.

En esta Tabla se observa un predominio de la temperatura 0, lo que es lo mismo, de la sobresaturación, frente a la agitación y la cantidad de siembra.

Para una siembra de 4 g/l, a las dos temperaturas de trabajo, se observa que el descenso global de la conductividad es menor a la menor velocidad de agitación (100 r.p.m.). Esto se ha de explicar en base a que un aumento de la agitación hace que la nucleación secundaria sea más intensa generando un mayor número de cristales subcríticos que se disuelven (Strickland-Constable, 1976) y la velocidad a que se rebaja la conductividad es menor.

El aumento en la cantidad de siembra, de 4 a 8 gr/l, es de dudosa eficacia, dadas las dificultades técnicas que conlleva.

Al cabo de una hora, la velocidad a que se rebaja la conductividad es prácticamente igual en todos los casos, pero el descenso global sigue la pauta de los diez primeros minutos.

Comparando las condiciones de máximo rendimiento a las dos temperaturas, 14,1 % para -4° C, 400 r.p.m. y 8 gr/l, y 11,2 % para 0° C, 100 r.p.m. y 4 gr/l, vemos que no se consiguen en las mismas

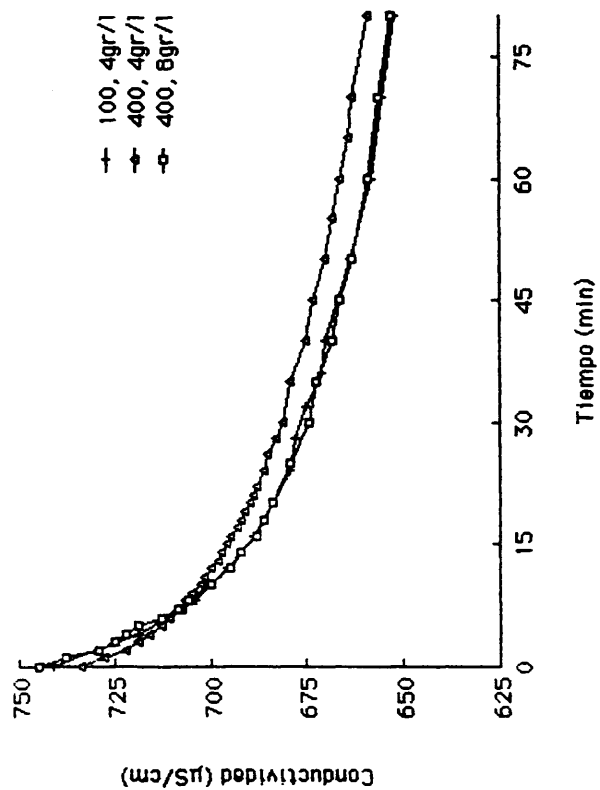


Figura 4.7. Variación de la conductividad específica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) frente al tiempo en las experiencias de precipitación del KHT en vinos, con siembra de 4 y 8 g/l de cristales de KHT, a 0°C , a distintas velocidades de agitación. Agitador magnético.

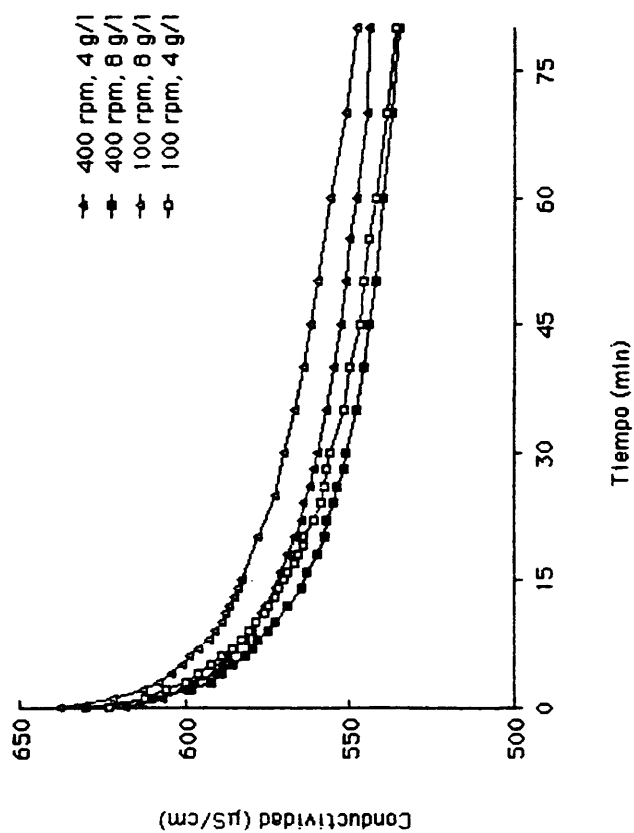


Figura 4.8. Variación de la conductividad específica ($\mu\text{S/cm}$) frente al tiempo en las experiencias de precipitación del KHT en vinos, con siembra de 4 y 8 g/l de cristales de KHT, a -4°C , a distintas velocidades de agitación. Agitador magnético.

Tabla 4.6. Conductividad específica inicial, X_0 , disminución de la conductividad en los primeros diez minutos, $\Delta X_{0,10}$, en la primera hora, $\Delta X_{0,60}$, entre los sesenta y setenta minutos, $\Delta X_{60,70}$, y tanto por ciento de la disminución de la conductividad en una hora de tratamiento, $\% \Delta X_{0,60}/X_0$ en las distintas condiciones experimentales de precipitación del KHT en vinos, con siembra.

Condiciones experimentales	X_0	$\Delta X_{0,10}$	$\Delta X_{0,60}$	$\Delta X_{60,70}$	$\% \Delta X_{0,60}/X_0$
-4°C, 400 rpm, 8 g/l	630	57	90	3	14,1
-4°C, 100 rpm, 8 g/l	638	49	81	5	12,7
-4°C, 400 rpm, 4 g/l	618	41	70	3	11,3
-4°C, 100 rpm, 4 g/l	623	44	82	3	13,2
0°C, 400 rpm, 8 g/l	798	45	86	3	10,8
0°C, 400 rpm, 4 g/l	734	31	67	3	9,1
0°C, 100 rpm, 4 g/l	741	41	83	3	11,2

condiciones de trabajo, lo que pone de manifiesto la complejidad del fenómeno y la importancia de las condiciones hidrodinámicas del sistema. Operar a la temperatura más baja lleva consigo un mayor consumo energético y, por tanto, sólo un estudio económico puede decidir en favor de una u otra temperatura de trabajo.

4.3.2.2 Temperaturas de saturación y estabilidad del vino después del tratamiento.

El objetivo de la estabilización por frío es conseguir la ausencia de precipitados tartáricos en el vino embotellado después que sale de la bodega. Para optimizar el procedimiento de estabilización es preciso tener en cuenta las condiciones de almacenamiento y consumo de los vinos.

Usseglio-Tomasset y Bosia (1982), calculan el producto de solubilidad del bitartrato potásico en soluciones agua-alcohol a distintas temperaturas y graduaciones alcohólicas. Considerando al vino como una solución hidroalcohólica y conociendo su producto de concentraciones termodinámico, PC_T , siguiendo el proceso inverso, se puede calcular la temperatura de saturación del mismo. La única intervención del resto de los componentes ajenos al equilibrio de precipitación que considera es la correspondiente a la fuerza iónica del medio y al coeficiente de actividad de los iones precipitantes. Al hacer esto, se ignoran los fenómenos de formación de complejos y de inhibición de los núcleos nacientes.

Para 11° alcohólicos, la ecuación que, según estos autores, relaciona la temperatura de saturación con el producto de solubilidad termodinámico es:

$$T_{sat,T} = (-1,6958426 + \sqrt{2,8758821 - (0,672255(20,955735-L))}) / 0,3361275$$

donde $L = PC_T \cdot 10^6$.

Vurdig y col. (1982) con un método empírico, basado en medidas conductimétricas, calcula la temperatura de saturación del vino, supuesta por debajo de 20° C. Este método parece más fiable puesto que pretende evaluar también los fenómenos ignorados en un cálculo termodinámico estricto como el expuesto por Usseglio-Tomasset y Bosia (1982). Sin embargo, parece lógico pensar que debido a la distinta composición del vino, según sea su origen, la variedad de uva, el tipo de vinificación, etc., la expresión utilizada por estos autores puede tener distinta expresión para cada tipo de vino.

Usseglio-Tomasset y Bosia, 1982, han comparado ambos métodos sin encontrar diferencias significativas entre ambos. Nosotros hemos aplicado ambos métodos obteniendo los resultados que se recogen en la Tabla 4.7. En esta Tabla vemos que, en todos los casos, la temperatura de saturación termodinámica, es decir la calculada por el método propuesto por Usseglio Tomasset y Bosia (1982), es superior a la obtenida por métodos conductimétricos como propone Vurdig y col. (1982). Esto significa, que para un producto de concentraciones dado, la temperatura de saturación es menor en un vino que en una solución de la misma graduación alcohólica y la misma fuerza iónica y que la sobresaturación a una misma temperatura será menor en el vino que en el medio sintético. Esto ha de explicarse, necesariamente, por la intervención de otras especies químicas en el equilibrio de precipitación.

El vino inicial tiene una temperatura de saturación termodinámica de 24,4°C y una temperatura de saturación conductimétrica de 16,9°C.

Tabla 4.7. Temperatura de saturación de los vinos según cálculos termodinámicos ($T_{sat,\tau}$) y por medidas conductimétricas ($T_{sat,x}$).

$T(^{\circ}C)$	$\omega(rpm)$	siembra	PC 10^6	PC τ 10^6	$T_{sat,\tau}$	$T_{sat,x}$
Vino inicial			224,9	154,9	24,4	16,9
Vino tratado -4 $^{\circ}C$	400	8 g/l	87,1	59,6	10,9	8,1
Vino tratado -4 $^{\circ}C$	100	8 g/l	91,4	62,6	11,5	8,3
Vino tratado -4 $^{\circ}C$	400	4 g/l	90,7	62,1	11,4	8,4
Vino tratado -4 $^{\circ}C$	100	4 g/l	112,0	76,6	13,8	11,4
Vino tratado 0 $^{\circ}C$	400	8 g/l	108,0	74,2	13,5	10,9
Vino tratado 0 $^{\circ}C$	100	8 g/l	97,1	66,5	12,2	10,8
Vino tratado 0 $^{\circ}C$	400	4 g/l	110,0	75,0	13,6	11,4
Vino tratado 0 $^{\circ}C$	100	4 g/l	123,0	84,3	15,0	13,3

Teniendo en cuenta que esta temperatura se calcula por el incremento de conductividad que, a 20°C experimenta el vino cuando se le añade una cantidad de KHI, se puede asegurar que a 20°C, el vino no se encuentra sobresaturado, por lo que se deduce que un cálculo termodinámico conduce a un valor erróneo de la temperatura de saturación. Entre ambas temperaturas existe una relación lineal de la forma:

$$T_{sat. \tau} = 5,07 + 0,74 T_{sat. t}$$

con un coeficiente de correlación de 0.96. La diferencia entre ambas temperaturas podría dar idea de la extensión de los fenómenos de formación de complejos y de inhibición que marcan la diferencia entre el vino y la solución hidroalcohólica. La diferencia entre las temperaturas medias de saturación, termodinámica y conductimétrica, del vino es de 2.4° C, es decir, del 19 al 23 % menos, lo que puede dar idea de la importancia del fenómeno.

Algunos autores (Maujean y col. 1984) han intentado relacionar la temperatura de saturación con la concentración de los iones precipitantes. En la Tabla 4.8, se expone el resultado de un ajuste por mínimos cuadrados entre la concentración del ión potasio y del ión bitartrato y la temperatura de saturación termodinámica y conductimétrica. Se observa un buen ajuste ($r > 0.99$) entre la concentración de ión potasio y la temperatura de saturación termodinámica.

Existe un test basado en medidas conductimétricas (Vialatte, 1984), que se utiliza en algunas bodegas, para comprobar la estabilidad del vino después de sufrir el tratamiento por frío. Este test consiste en medir el descenso en conductividad que experimenta el

Tabla 4.8. Ecuaciones de regresión entre la temperatura de saturación (y) y la concentración de los iones precipitantes (x).

y	x	Regresión de y sobre x	r
T _{sat.} x	[K ⁺] mgr/l	$y = -0.992 + 0.0381 x$	0.923
T _{sat.} r	[K ⁺]	$y = -3.7697 + 0.0560 x$	0.993
T _{sat.} x	[HT ⁻] meq/l	$y = -10.8055 + 1.5620 x$	0.924
T _{sat.} r	[HT ⁻]	$y = -17.5148 + 2.2470 x$	0.971
T _{sat.} x	PCr	$y = -4.1047 + 0.0874 x$	0.919

vino cuando a 0°C se le añade KHT a razón de 10 gr/l y compararlo con el valor inicial de la conductividad. Si la disminución de la conductividad no supera en un 5 % el valor inicial de la conductividad, el vino se considera estable, en caso contrario, debe ser sometido otra vez a tratamiento por frío. Este test dió como estables a todos los vinos tratados y únicamente resultó inestable el vino base antes de ser sometido a tratamiento por frío.

Esto nos permite concluir que para un vino, bastarían las condiciones más económicas utilizadas: 0°C, 100 r.p.m. y 4 gr/l de siembra. En el caso de vinos base destinados a la elaboración de cava, hay que tener en cuenta el aumento en el grado alcohólico, consecuencia de la fermentación en botella, y evaluar su efecto para la puesta a punto de un método de extracción del KHT.

4.3.2.3 Cinética de la precipitación.

En la Tabla 4.9 se muestran los test de las cinéticas de precipitación, que se ha confeccionado siguiendo las directrices marcadas en el apartado correspondiente a la nucleación homogénea: coeficiente de correlación mayor de 0.99 e intervalos lo más extensos posibles. En los casos en que no aparecen resultados es por que no se ha encontrado un buen coeficiente de correlación en un intervalo de tiempo comparable al resto, pudiéndose interpretar como un cambio continuo de la constante de velocidad. El coeficiente de correlación >0.99, obtenido en todos los casos permite aceptar que la cinética de la reacción de precipitación del KHT, en vinos con siembra, es de primer orden.

De la Tabla 4.9 se deducen las siguientes observaciones:

Tabla 4.9. Valores de las constantes de velocidad, K (min^{-1}), de la reacción de precipitación de KHT a distintos intervalos de tiempo (min), y coeficiente de regresión, r , en experiencias con siembra, suponiendo, una cinética de precipitación de primer orden.

Condiciones experimentales	Intervalo de tiempo min	Constante	
		min^{-1}	r
-4°C, 400 rpm, 8g/l	2-20	0.0297	0.992
	24-50	0.0110	0.996
	60-130	0.0067	0.996
-4°C, 400 rpm, 4g/l	4-22	0.0301	0.995
	35-50	0.0161	0.999
-4°C, 100 rpm, 4g/l	8-19	0.0239	0.997
	8-28	0.0203	0.991
	35-80	0.0087	0.998
0°C, 400 rpm, 8g/l	2-7	0.1044	0.990
	20-70	0.0252	0.999
0°C, 400 rpm, 4g/l	2-80	0.0208	0.994
0°C, 100 rpm, 4g/l	8-20	0.0254	0.997
	24-130	0.0144	0.993

- El efecto de las distintas variaciones experimentales se amortigua a -4°C , cuando la sobresaturación es mayor. Esto no hace más que destacar el predominio de la sobresaturación sobre el resto de las variables.
- Los valores de las constantes de velocidad a las dos temperaturas son comparables y la conveniencia de una u otra debe ser puesta de manifiesto por un estudio económico de la instalación.

4.3.2.4 Estequiometría de la precipitación.

La Tabla 4.10 muestra los resultados de las determinaciones analíticas a los vinos realizadas antes y después de los distintos tratamientos. Como dato más destacable hay que señalar que el descenso en la concentración de los iones precipitantes, es estequiométrico. Al comparar este resultado con el correspondiente a la estequiometría de la precipitación del KHT en las experiencias de precipitación sin siembra, se pone de manifiesto que la siembra de cristales de KHT es el procedimiento idóneo para eludir la acción de los inhibidores de crecimiento del KHT a partir de vinos.

Tabla 4.10. Relación entre la concentración de K^+ y HT^- precipitado en las experiencias de precipitación del KHT, con siembra de cristales, en vinos a $0^\circ C$, en distintas condiciones experimentales.

	pH	H ₂ I g/l	%HT ⁻	HT ⁻ meq/l	ΔHT^- meq/l	K^+ ppm	ΔK^+ meq/l	$\Delta K^+/\Delta HT^-$
Vino inicial	3.10	5.20	51.8	17.96	-	488	-	-
Vino tratado:								
-4°C, 400 rpm, 8g/l	2.98	4.18	46.0	12.80	5.16	265	5.71	1.11
-4°C, 100 rpm, 8g/l	2.98	4.21	46.0	12.90	5.05	276	5.43	1.08
-4°C, 400 rpm, 4g/l	2.99	4.29	46.5	13.30	4.67	266	5.09	1.22
-4°C, 100 rpm, 4g/l	3.01	4.43	47.5	14.00	3.93	311	4.54	1.16
0°C, 400 rpm, 8g/l	3.00	4.32	47.0	13.50	4.42	312	4.51	1.02
0°C, 100 rpm, 8g/l	3.01	4.11	47.5	13.00	4.95	291	5.27	1.06
0°C, 400 rpm, 4g/l	2.99	4.29	46.5	13.30	4.65	321	4.28	0.92
0°C, 100 rpm, 4g/l	3.04	4.65	48.9	15.20	2.81	317	4.38	1.56

%HT⁻ representa el porcentaje de ácido tartárico en forma de ión bitartrato al pH y grado alcohólico del vino, según la Tabla 3.3.
 ΔHT^- representa los miliequivalentes de ión bitartrato precipitado.
 ΔK^+ representa los miliequivalentes de ión potasio precipitado.
 $\Delta K^+/\Delta HT^-$ miliequivalentes de potasio precipitados por miliequivalente ión bitartrato.

4.3.3 CRECIMIENTO DEL KHT A PARTIR DE VINOS.

4.3.3 Aspectos morfológicos y estructurales del KHT.

En este apartado se estudia la estructura cristalina del KHT y el papel que juegan los inhibidores presentes en el vino sobre el mecanismo de crecimiento.

4.3.3.1 Estructura cristalina y morfología de los cristales de KHT.

El KHT es una sal ácida del ácido tartárico con los siguientes parámetros de célula (Von Bommel y Bijvoet, 1958; Buschmann y Luger, 1985):

Sistema cristalino ortorrómbico.

Grupo Espacial $P2_12_12_1$

Dimensiones de célula $a = 7.749 \text{ \AA}$

$b = 10.582 \text{ \AA}$

$c = 7.604 \text{ \AA}$

Volumen de célula $= 623.5 \text{ \AA}^3$

$Z = 4$

densidad $= 1.96 \text{ gr/cc.}$

La ficha ASTM 25644 y 25644 A, Tabla 4.11, muestran las intensidades relativas de los distintos picos de difracción correspondientes a los espaciados de los planos (hkl) de índices más bajos correspondientes al grupo espacial. Estos datos han sido comparados con los obtenidos a partir de cristales de KHT puro (Merck ref. 4892, Figura 4.9) y de cristales de KHT precipitados en los vinos (Figura 4.10), no encontrándose diferencias significativas.

La estructura del cristal de KHT consiste (Buschmann y Luger, 1985) en una disposición tridimensional de aniones bitartrato

25-644 25-643

Joint Committee on Powder Diffraction Standards 1975

d	5.66	3.81	2.88	6.29	$C_4H_5KO_5$	$KC_4H_5O_5$	★
I/I ₁	100	85	80	18	Potassium Hydrogen Tartrate		
Rad. CuKα1	1.5405	Filter	Guinier	114.6mm	d A	I/I ₁	hkl
Cut-off	50Å	I/I ₁	Photometer	I/I ₁ exp. = 0.34	6.29	18	110
Ref.	Technisch Physische Dienst, Delft, Holland				6.19	14	011
					5.66	4	101
					5.32	20	020
Sys. Orthorhombic		S.G. $P2_12_12_1$ (19)			4.85	20	111
a ₀ 7.789	b ₀ 10.648	c ₀ 7.611	A 0.7315	C 0.7148	4.40	12	120
α	β	γ	Z 4	D ₂ 1.979	3.995	20	200
Ref. Ibid.					3.806	85	121,002
					3.658	100	210
					3.554	25	012
ee	D	α=β	mp	Color	3.467	4	201
2V	1.86				3.419	8	102
Ref. Van Bommel and Bijvoet, Acta Cryst., 11 61 (1958)					3.297	18	211
					3.256	6	112
*S.G. from: Van Bommel and Bijvoet, loc. cit.					3.230	65	130
Compound is a p.a.-chemical					3.217	50	031
Below d = 1.60 only lines with I/I ₁ > 3 are given.					3.143	6	220
To replace 1-1135.					3.094	6	022
See following card					2.974	20	131
					2.908	60	221
							2.100
							18
							142,312

Form 7-64
P

25-644A 25-648

Joint Committee on Powder Diffraction Standards 1975

d	5.66	3.81	2.88	6.29	$C_4H_5KO_5$	$KC_4H_5O_5$	★
I/I ₁	100	85	80	18	Potassium Hydrogen Tartrate		
Rad. A		Filter		Dis. I/I ₁ rec.	d A	I/I ₁	hkl
Cut-off					2.085	12	213
Ref.					2.030	8	331
					1.995	2	133
					1.984	10	151
Sys. Orthorhombic		S.G. $P2_12_12_1$			1.974	8	223
a ₀ 7.789	b ₀ 10.648	c ₀ 7.611	A 0.7315	C 0.7148	1.947	6	400
α	β	γ	Z 4	D ₂ 1.979	1.902	10	004,242
Ref. Ibid.					1.872	4	014
					1.858	12	052,411+
					1.848	2	104
ee	D	α=β	mp	Color	1.836	4	332,043
2V	1.86				1.822	2	114,233
Ref. Van Bommel and Bijvoet, Acta Cryst., 11 61 (1958)					1.805	6	341,152
					1.788	12	143,313
					1.776	10	060,421
					1.747	12	124
					1.729	8	061,160
					1.710	12	204,412+
					1.687	6	161,214
See preceding card					1.677	4	252,254

Form 7-64
P

Tabla 4.11. Fichas ASTM nº 25-644 y 25-644 A correspondientes al bitartrato potásico.

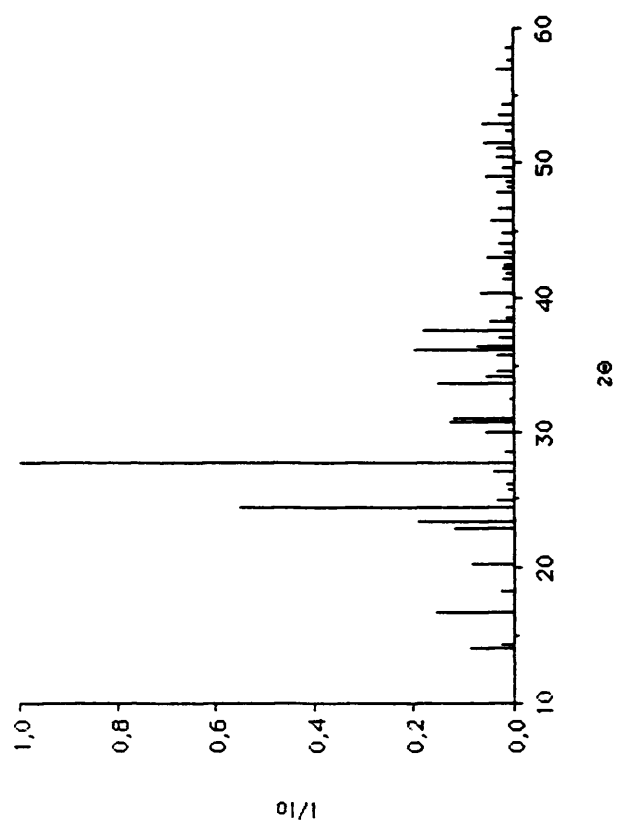


Figura 4.9. Difractograma de Rayos X correspondiente al bitartrato potásico puro.

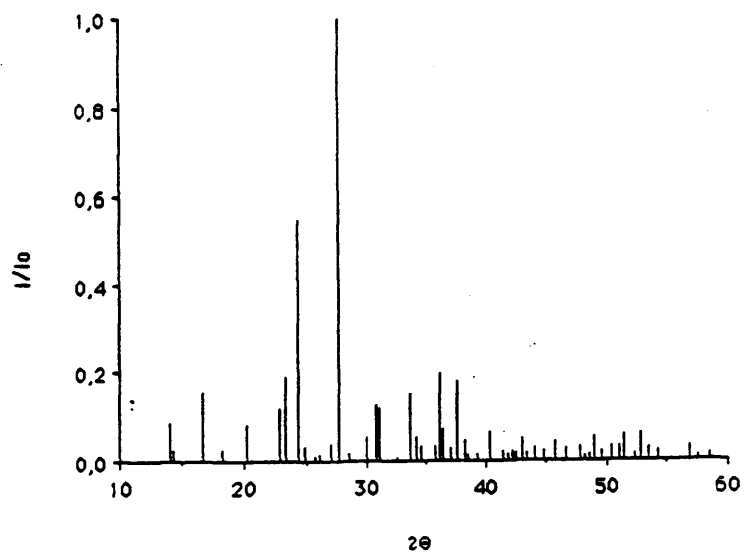


Figura 4.10. Difractograma de Rayos X del precipitado obtenido en las experiencias de precipitación en vinos realizadas en el laboratorio.

conectados por puentes de hidrógeno, con tendencia a formar capas de aniones seguido por capas de cationes perpendiculares a la dirección [010] (Figura 4.11).

Si consideramos las interacciones potasio-bitartrato como el único factor estructural en el cristal, éste debería crecer alargado en la dirección [010] debido a la fácil incorporación de los iones positivos y negativos en la cara de alta densidad de carga.

Sin embargo, se ha encontrado (Buschman y Luger, 1985) que los puentes de hidrógeno juegan un papel importante en este modelo. La unión de los iones bitartrato a través de puente de hidrógeno, crea una dirección preferente de enlace, "Periodic Bound Chain" (PBC), sobre la cara haciendo que crezca más despacio. Esta PBC hace que la carga esté más deslocalizada y por tanto la cara polariza menos a la solución y atrae menos a los iones de la misma.

La regla de Bravais sugiere que las caras de mayor espaciado deben ser, morfológicamente, las más importantes. Estas caras son los prismas {110}, {011}, {101}, los pinacoides {010}, {100} y {001}, y los bifenoides {111} y $\bar{1}\bar{1}\bar{1}$ que efectivamente son las observadas en los cristales de KHT (Figura 4.12).

4.3.3.2 Formas y mecanismo de crecimiento.

Los cristales de KHT crecidos a partir de soluciones hidroalcohólicas y vinos, durante los primeros estadios de la precipitación, presentan caras planas. Teniendo en cuenta los valores de los datos de solubilidad dados por Berg y Keefer (1958) y usando la fórmula propuesta por Nielsen (1984) para el cálculo de la energía libre, Γ :

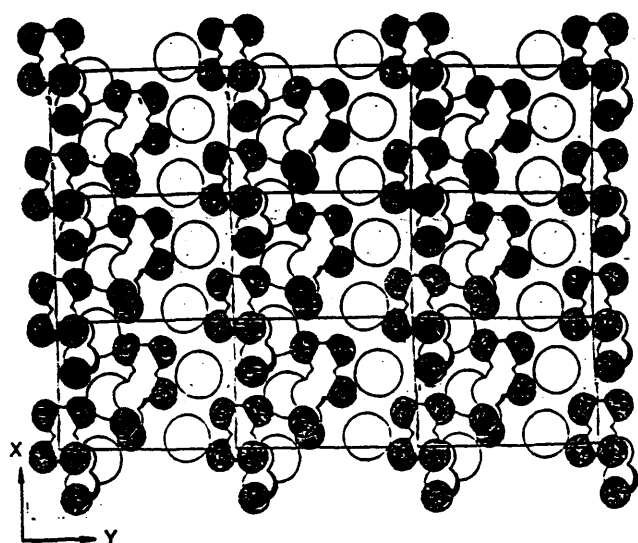


Figura 4.11. Proyección de la estructura cristalina del bitartrato potásico sobre el plano XY. Los círculos grandes huecos indican potasio, los círculos sombreados oxígeno y los círculos pequeños huecos carbono.

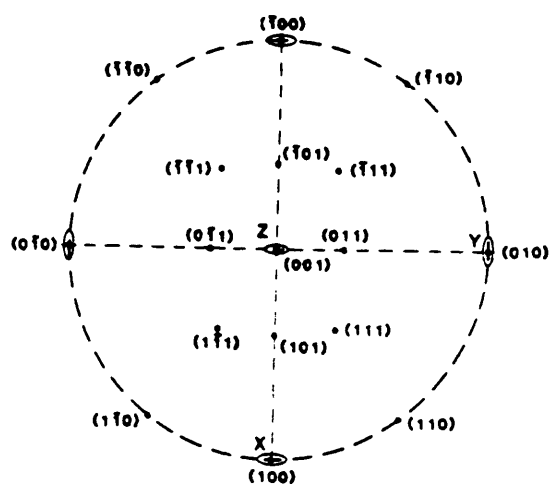


Figura 4.12. Proyección estereográfica de las morfologías observadas en los cristales de bitartrato potásico.

$$\Gamma/KT = 2.82 - 0.272 \ln(C_{\text{sat}} \text{ mol m}^{-3}) \quad [4.3]$$

donde C_{sat} es la solubilidad expresada como mol/m^3 a 0°C ,

K es la constante de Boltzman y

T es la temperatura absoluta.

El valor que se obtiene es $\Gamma = 8.74 \cdot 10^{-21}$ julios.

La energía específica de superficie, γ , para el KHT en una solución hidroalcohólica de 11° se calcula según:

$$\gamma = \Gamma/a^2 = 0.04793 \text{ J/m}^2 = 47.93 \text{ erg/cm}^2$$

donde a es el diámetro de la unidad de crecimiento con un valor medio de 4.27 \AA , considerando la celda unidad formada por 4 iones bitartrato y 4 iones potasio.

Este valor contrasta con el obtenido, en el apartado 4.1, a partir de las experiencias correspondientes a la influencia de la sobresaturación, por medida del tiempo de inducción, que ha sido de 0.0089 J/m^2 . Aunque es cierto que la ecuación 4.1, es perfectamente aplicable a electrólitos 1:2 y 2:2, pudiendo presentar desviaciones cuando se aplica a electrólitos 1:1 (Nielsen, 1981), una diferencia tan grande, debe ser explicada por la participación de un mecanismo de nucleación heterogénea en la precipitación del KHT a partir de soluciones hidroalcohólicas.

El factor entrópico de superficie, α , es una medida de la rugosidad de la superficie del cristal. Se calcula según:

$$\alpha = 4\gamma/KT = 9.27$$

este valor de α se corresponde con un cristal limitado por caras planas tal y como se observa en los obtenidos a partir de soluciones hidroalcohólicas y en los primeros estadios de la precipitación a partir de vinos.

La forma de los cristales de KHT varía según las condiciones de crecimiento. Los cristales obtenidos a partir de soluciones hidroalcohólicas presentan (Figura 4.13, 4.14) las formas: $\{111\}$, $\{11\}$, $\{110\}$, $\{101\}$, $\{011\}$, $\{010\}$, $\{001\}$ y $\{100\}$ combinadas de distintas maneras, pero con predominio de $\{010\}$, $\{111\}$ y $\{101\}$. Algunos cristales muestran (Figura 4.14) elongación a lo largo de la dirección $[010]$, lo que está en concordancia con el análisis estructural. Las formas de crecimiento de los cristales sencillos de KHT obtenidos a partir de agua caliente son $\{010\}$, $\{111\}$, $\{111\}$, $\{110\}$ y $\{120\}$, con un hábito equidimensional rugoso.

Las formas de crecimiento de los cristales de KHT obtenidos a partir de vinos son similares a los obtenidos a partir de soluciones hidroalcohólicas, pero su evolución es más compleja. En los primeros estadios de la precipitación, encontramos la misma combinación de formas que en las soluciones (Figura 4.15). Posteriormente, el desarrollo de la cara $\{010\}$ comienza a ser la dirección más importante del cristal. En los últimos estadios del desarrollo, las caras bifenoidales y prismáticas evolucionan hacia caras curvas, primero la forma $\{111\}$ y después la $\{011\}$, como se puede observar en la Figura 4.16. Esta evolución se puede observar también en cristales más grandes como los mostrados en la Figura 4.17, donde se contempla la completa evolución desde formas poliédricas limitadas por $\{001\}$, $\{100\}$ y $\{111\}$ hasta un cristal de formas irregulares con caras curvas formadas por la creación y apilamiento de macroescalones.

La observación de la superficie de los cristales crecidos a partir de una solución hidroalcohólica, muestra la presencia de macroescalones paralelos a la dirección $[100]$ en las caras $\{010\}$

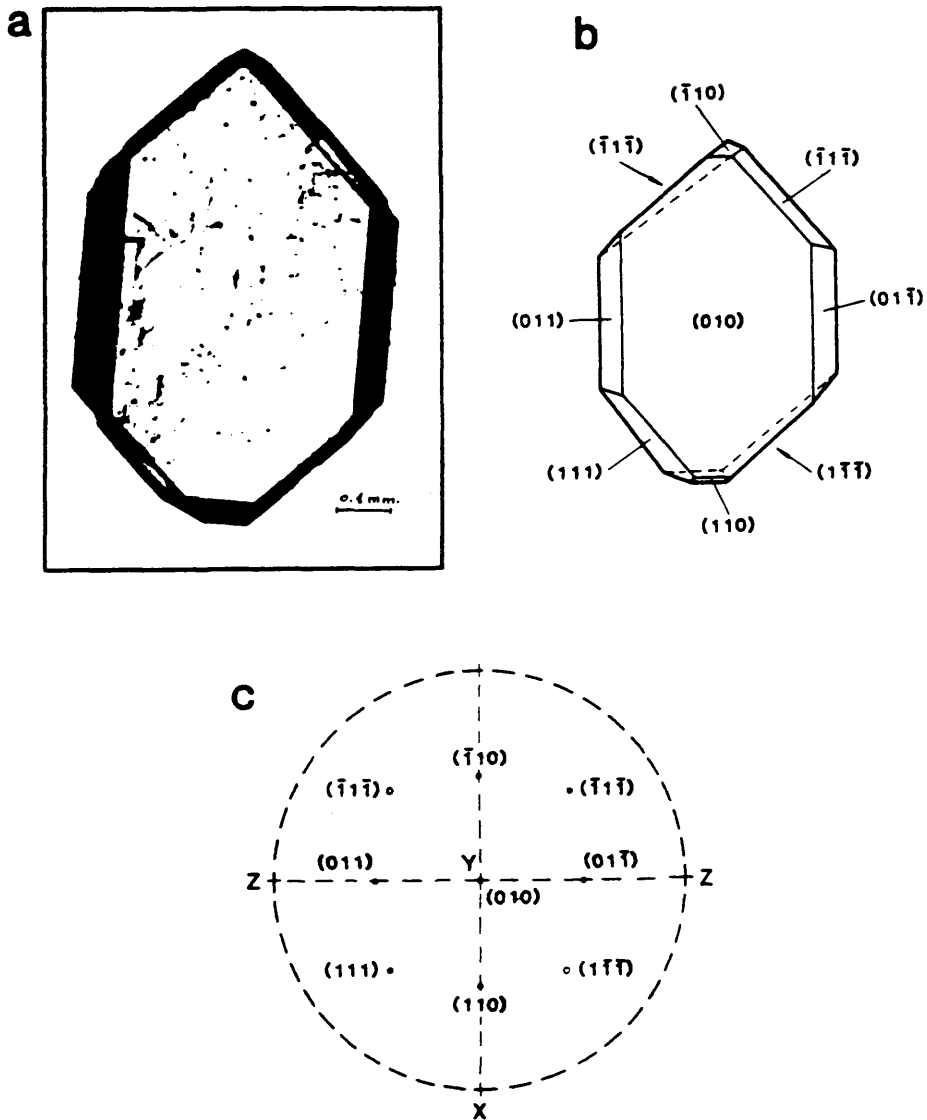


Figura 4.13 a) Cristal de bitartrato potásico obtenido en una solución acuosa, que presenta escalones sobre su superficie. b) Índices de Miller de las caras del cristal. c) Proyección estereográfica del cristal.

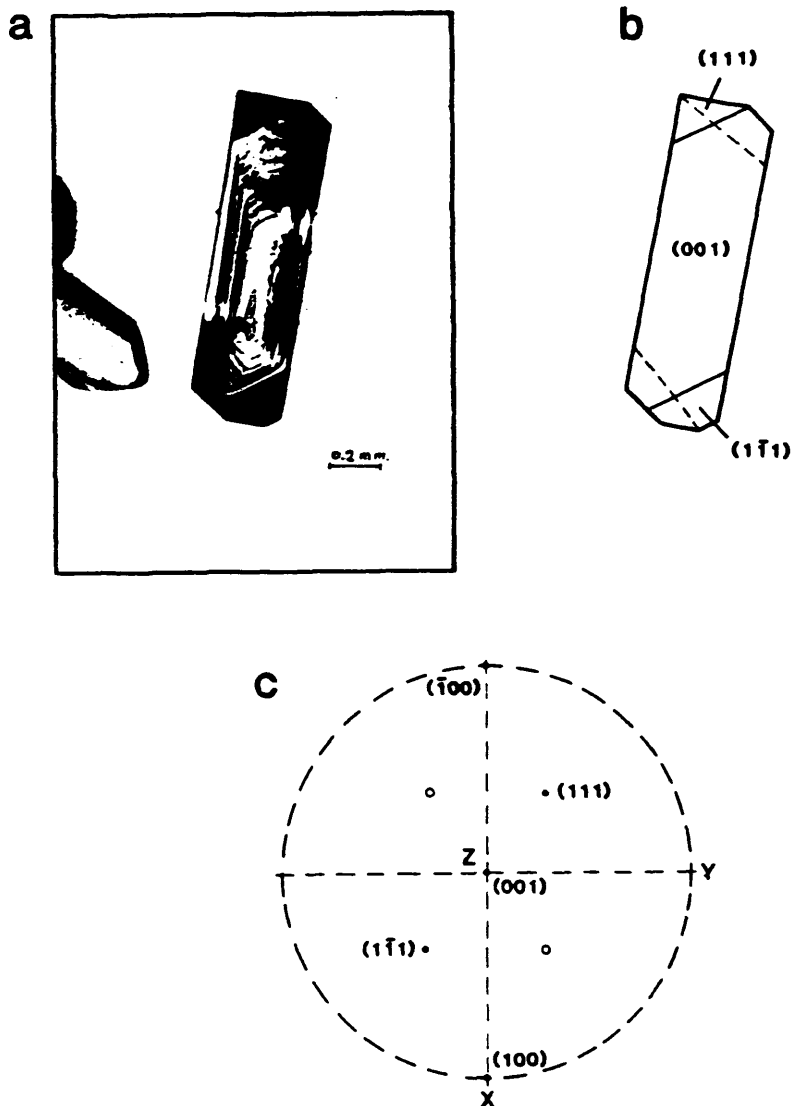


Figura 4.14. a) Cristal de bitartrato potásico obtenido en una solución hidroalcohólica de 10° alcohólicos. b) Índices de Miller de las caras del cristal. c) Proyección estereográfica del cristal.

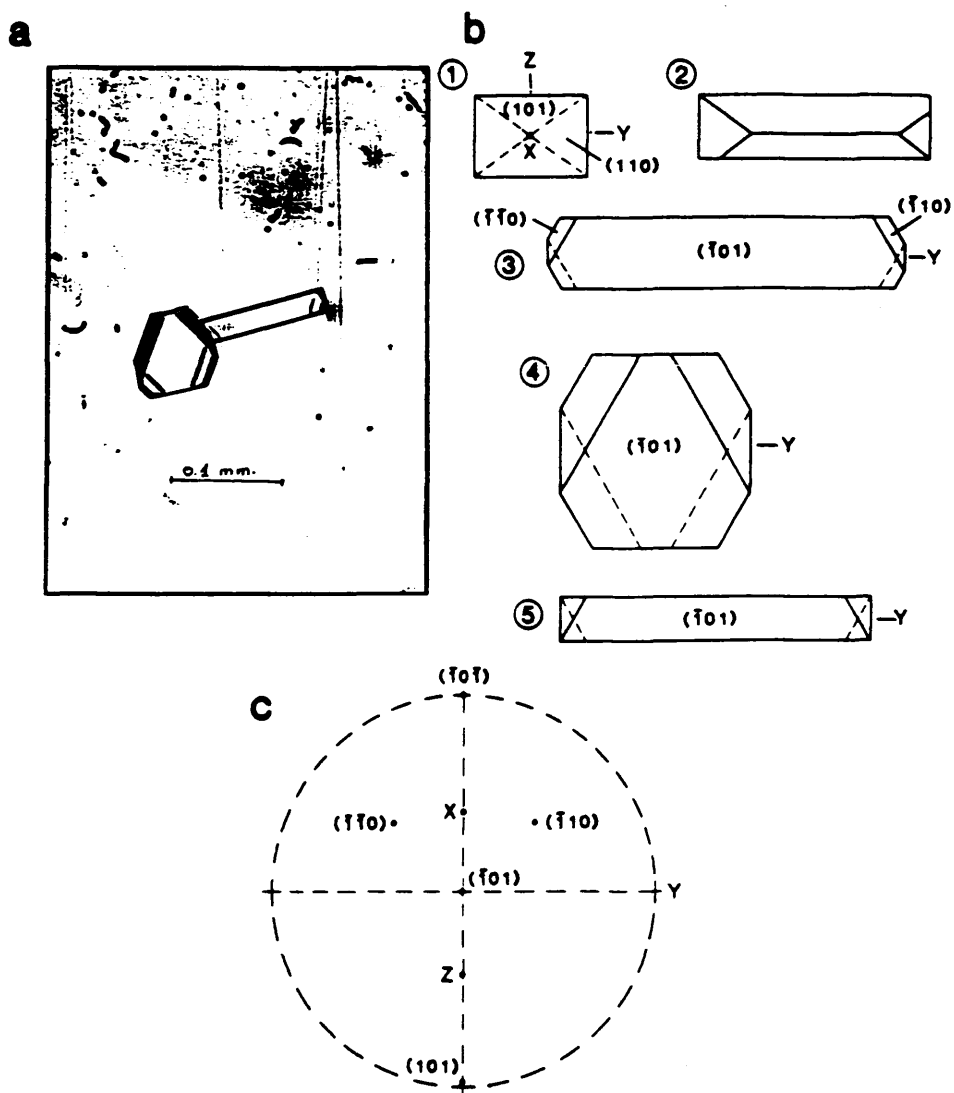


Figura 4.15. Cristal de bitartrato potásico obtenido en un vino blanco. b) Índices de Miller de las caras de las distintas formas del cristal observadas en a). c) Proyección estereográfica del cristal.

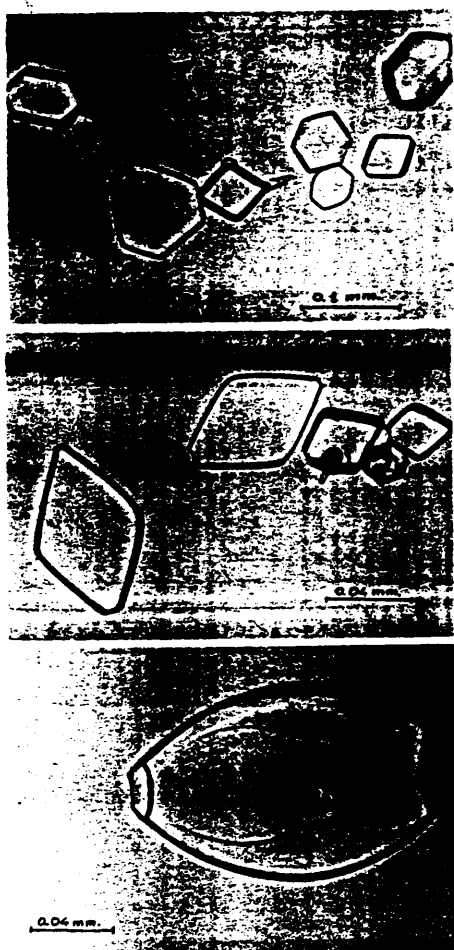


Figura 4.16. Formación y desarrollo de caras curvas en cristales de KHT en vinos blancos. a) Coexistencia de hábitos poliédricos y redondeados. b) Estadios avanzados en la formación de caras curvas. c) Caso extremo de caras redondeadas.

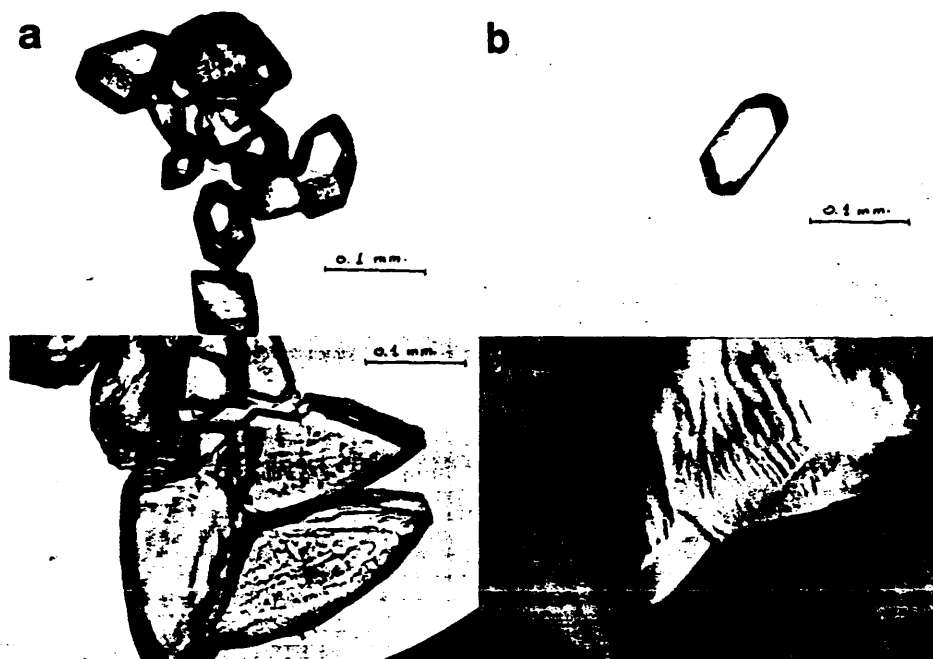


Figura 4.17. Evolución de los cristales de bitartrato potásico creciendo en vinos. a) Formación de macroescalones de algunas caras de cristales poliédricos. b) Degeneración morfológica de un cristal prismático. c) Ampliación de una cara que presenta degeneración morfológica. d) Aspecto final de los cristales de bitartrato potásico en vinos mostrando caras curvas y macroescalones en sus superficies.

(Figura 4.18). Un cuidadoso examen de esta cara muestra la formación de núcleos bidimensionales en las aristas de los macroescalones, lo que indica la existencia de un alto grado de sobresaturación.

La morfología final de los cristales de KHT crecidos a partir de vinos puede explicarse de la siguiente manera: La cara (010) permanece bloqueada y las otras caras se redondean debido al apilamiento y bloqueo de los escalones.

El análisis de la estructura del cristal da alguna idea acerca de las posibles unidades de crecimiento y la estructura de las soluciones hidroalcohólicas. El ión potasio es un ión de gran tamaño y baja carga por lo que está poco polarizado y tiene poca tendencia a formar complejos con el agua, en realidad, se puede considerar que tiene un efecto destructor de la estructura del agua en solución (Samoilov, 1965). Su interacción con el etanol presente en la solución es también muy pequeña.

Por el contrario, los iones bitartrato, sí son capaces de formar complejos con el agua a través de los grupos carboxilo e hidroxilo presentes en su molécula. También hay que considerar la posibilidad de que los iones bitartrato reaccionen entre sí para formar dímeros monodentados o bidentados, aunque dada la concentración en que se encuentran, del orden de 0.01 mol/l, esto sea poco probable a pesar de ser estructuralmente posible.

En una primera aproximación, se puede considerar a los iones potasio y bitartrato solvatados como las auténticas unidades de crecimiento, tanto en los procesos de nucleación como de crecimiento de los cristales.

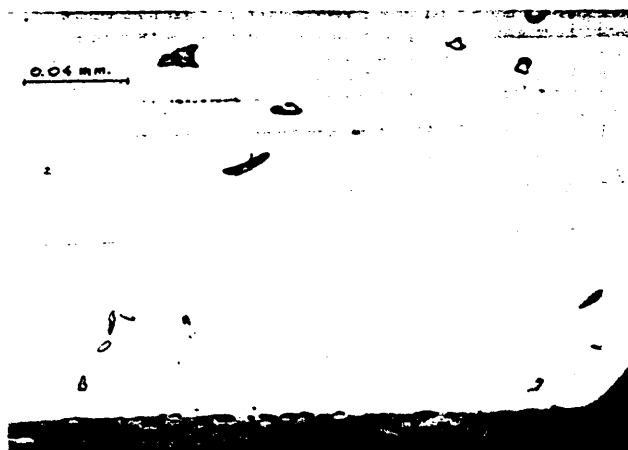


Figura 4.18. Ampliación del cristal de bitartrato potásico mostrado en la figura 4.13. que muestra escalones en su superficie y la formación de ucleos bidimensionales en sus aristas.

En la estructura del cristal, los iones potasio están unidos a 8 átomos de oxígeno situados a una distancia media de 2.867 Å. Los aniones bitartrato se unen a través de 6 puentes de hidrógeno con distancias O-O que oscilan entre 2.735 Å y 2.532 Å (en la dirección [100]). Esto sugiere que el enlace entre iones bitartrato a través de puentes de hidrógeno juega un papel primordial en la estructura del KHT. El empaquetamiento en la dirección [010] presenta un eje 2, que impone un orden de apilamiento de las unidades de crecimiento incorporadas al cristal a través de la cara (010). Los escalones monatómicos sobre esta cara, estarán formados por aniones o cationes independientemente de su orientación. En consecuencia, la complejidad geométrica de los aniones bitartrato nos permite suponer el siguiente mecanismo de crecimiento:

- 1) Las unidades de crecimiento, K^+ y HT^- , llegan a la superficie del cristal a través de la capa de adsorción del cristal.
- 2) El ión potasio se integra fácilmente en la red gracias a su interacción iónica con el ión bitartrato.
- 3) Los iones bitartrato, para integrarse en el cristal deben difundirse a través de la capa de adsorción y deshidratarse.

Esto explica la dependencia de la cinética del KHT con la velocidad de agitación. El transporte de los productos de deshidratación fuera de la superficie cristalina debe ser un factor limitante de la cinética del KHT en condiciones de estabulación estática.

- 4) Los iones bitartrato adsorbidos deben crear puentes de hidrógeno con el cristal en la dirección apropiada.

5) Existe un fuerte enlace entre iones bitartrato en la dirección [100] que define los perfiles de los escalones sobre las caras (010).

El mecanismo expuesto implica que al menos las caras (010) y los escalones paralelos a ellas situados en otras caras, pueden ser consideradas como superficies cubiertas de iones potasio. Estos iones entran fácilmente en la red a través de los escalones de crecimiento, sin embargo, los iones bitartrato entran en el cristal con dificultad, lo que hace que sea el proceso limitante de la velocidad si el transporte hacia la superficie es mayor que la velocidad de incorporación. Los enlaces entre iones bitartrato a través de puentes de hidrógeno paralelos a las caras (010) hacen que estas caras crezcan lentamente y por tanto sean morfológicamente las más importantes.

4.3.3.3 Crecimiento del KHT a partir de vinos.

La cristalización del KHT a partir de vinos es un proceso impredecible debido a la influencia mal conocida del resto de componentes presentes en el vino que actúan como impurezas. Sin embargo, se pueden destacar los siguientes fenómenos:

- a) La mayoría de los cristales obtenidos a partir de vinos presentan formas alargadas.
- b) La precipitación del potasio frente al bitartrato no es estequiométrica.
- c) Los vinos permanecen sobresaturados en KHT después del período de estabilización.

Estos tres hechos pueden ser atribuidos a la acción de las impurezas, que influyen tanto sobre la nucleación como sobre el

crecimiento del KHT en vinos. Las impurezas pueden favorecer o impedir la nucleación en una solución sobresaturada. La capacidad de estas impurezas para formar complejos puede favorecer la formación de núcleos y disminuir la barrera energética para la nucleación o el crecimiento. Sin embargo, también pueden actuar de manera contraria bloqueando ambos procesos.

Si el medio a partir del cual crecen los cristales tiene impurezas capaces de actuar en ambos sentidos, como es el caso del vino, las impurezas que bloqueen el crecimiento de los cristales por adsorción sobre los centros activos de crecimiento, determinan el proceso, al menos en los primeros estadios de la evolución del vino frente al KHT.

La acción de las impurezas tiene lugar debido a su adsorción selectiva sobre ciertas caras del cristal sobre las cuales son capaces de formar enlaces con el sustrato. Si su naturaleza y propiedades geométricas son similares a las unidades de crecimiento se incorporarán fácilmente al cristal, pero si no lo son, bloquearán el acceso de éstas hacia los rincones impidiendo la continuación del proceso de crecimiento.

La superficie del cristal de KHT ofrece la posibilidad de desarrollar enlaces iónicos o de puentes de hidrógeno con las unidades de crecimiento e impurezas. Las caras (010) tienen tendencia a adsorber más iones potasio y desequilibrar el balance de carga sobre la misma. Sin embargo, el balance de carga se puede obtener por interacción del exceso de iones potasio con la capa de adsorción del cristal, donde debe haber una alta concentración de iones bitartato.

En otras caras del cristal, el balance de carga podía conseguirse con los escalones paralelos a la cara (010).

En la composición del vino participan partículas cargadas, entre las que se encuentran los coloides. En nuestra opinión, los coloides cargados negativamente, tienden a adsorberse en las caras (010) debido a la alta densidad de carga positiva creada por los iones potasio. Inicialmente, estos coloides adsorbidos bloquean o ralentizan el crecimiento de esa cara haciéndola morfológicamente importante y bloquean progresivamente los escalones en otras caras redondeándolos.

La forma de los cristales en los momentos iniciales de la precipitación es idiomórfica, con caras planas y aristas agudas (Figura 4.15), y si el crecimiento continua, se desarrolla cierta rugosidad sobre las caras que evolucionan finalmente a caras curvas (Figura 4.16 y 4.17).

Si la adsorción de las impurezas fuera al azar sobre las caras del cristal, no se podrían obtener patrones regulares, por lo que se ha de aceptar un modelo de adsorción preferente sobre las caras.

Este mecanismo de adsorción explica la morfología típica de los cristales obtenidos como productos finales de la precipitación del KHT, independientemente del tipo de vino y la composición no estequiométrica del precipitado.

La composición no estequiométrica del precipitado, se ha de explicar por la adsorción sobre las caras del cristal de las impurezas con carga negativa, que quedan atrapadas por los iones potasio. Más tarde, los iones potasio de la capa de adsorción serán redissueltos en favor de una mayor precipitación de iones bitartrato debido a su mayor capacidad de formación de complejos.

Las proteínas presentes en el vino están cargadas positivamente. Así, es posible que interactúen con los iones bitartrato para formar complejos lo que se traduciría en una disminución de la concentración efectiva de los mismos. En estas circunstancias, el crecimiento debe ser precedido de la disociación de esos complejos lo que hace que tiendan a incorporarse en el exterior de la capa de adsorción, haciendo que el balance $\Delta[K] / \Delta[HT]$ sea negativo.

Los anteriores argumentos sugieren que la precipitación del KHT a partir de vinos es un proceso controlado por al menos tres parámetros:

- 1) La concentración efectiva de potasio y bitartrato en el medio.
- 2) La capacidad de adsorción de los coloides cargados sobre las caras del cristal.
- 3) La capacidad de los componentes del vino para formar complejos con el ión potasio y ión bitartrato.

Este último punto puede variar debido al carácter vivo del vino y determina la concentración real de las unidades de crecimiento o su coeficiente de actividad.

Los tres parámetros anteriores son responsables de la ausencia de equilibrio termodinámico en la precipitación del KHT en los vinos. La naturaleza cambiante del vino durante su evolución es responsable de las fluctuaciones en su comportamiento respecto a la capacidad de formación de complejos y los cambios en la concentración efectiva del K^+ y HT^- suponen un riesgo de precipitación en botella.

4.4 CONCLUSIONES.

1/ Se puede concluir que las cinéticas de precipitación del KHT a partir de los vinos o de soluciones hidroalcohólicas presentan características muy parecidas; las diferencias más notables son el período de inducción, considerablemente más largo en el caso de los vinos, y la mayor lentitud en la precipitación. En los dos casos, los episodios de precipitación se superponen, observándose que el mecanismo fundamental de la reacción de precipitación es el transporte de soluto, lo que permite describir el proceso como una reacción de primer orden.

2/ La agitación favorece la nucleación y el crecimiento, disminuyendo el período de inducción. La agitación con palas es más indicada para provocar la nucleación.

3/ En el caso de los vinos, un exceso de agitación, es perjudicial para provocar la precipitación.

4/ La diferencia del comportamiento cinético entre las soluciones y los vinos así como las anomalías estequiométricas, observadas en vinos, deben justificarse por la intervención del resto de compuestos presentes en el vino.

4/ Las anomalías estequiométricas, ponen de manifiesto la intervención de sustancias ajenas a los iones precipitantes.

5/ El comportamiento del KHT a partir de soluciones hidroalcohólicas o vinos difiere fundamentalmente por la presencia en este último de impurezas. La estructura cristalina del KHT permite definir a los iones potasio y bitartrato como unidades de crecimiento, pero sus cinéticas de integración en el cristal son diferentes. El ión potasio forma enlaces iónicos y se incorpora fácilmente al cristal, mientras

que los iones HT^- crean, además de los enlaces iónicos, puentes de hidrógeno con otros iones bitartrato y su incorporación al cristal esta dificultada por impedimento estérico. El mecanismo de crecimiento cristalino del KHT a partir de soluciones hidroalcohólicas y vinos es básicamente el mismo: transporte de los iones bitartrato y su cinética de integración son los procesos limitantes de la velocidad de crecimiento.

CAPITULO 5

COMPOSICION DE LOS VINOS BASE UTILIZADOS EN LA ELABORACION DE CAVAS.

RESUMEN.

Se aportan datos sobre la composición de los vinos base destinados a la elaboración de cavas. Se pretende acumular una información básica que permitirá interpretar mejor el fenómeno de la precipitación del KHT en el vino. Se le ha dedicado una especial atención al estudio de la fracción proteica por la importancia que tiene en este proceso y por ser la más desconocida del mosto y del vino.

5.1 INTRODUCCION.

Actualmente, es difícil relacionar el comportamiento de los vinos durante la estabilización por frío, o la estabilidad del producto final respecto al KHT, con algún parámetro analítico de los mismos. Los estudios sobre este tema son orientativos y van acompañados de un factor de riesgo o probabilidad en la estabilidad del producto (Berg y col., 1968; Usseglio-Tomasset, 1979). Pero es imprescindible, para tener un conocimiento más completo de todo el fenómeno de precipitación del KHT, conocer la composición de los vinos en los que tiene lugar.

Las características analíticas de los vinos base utilizados para la elaboración de vinos por el método champenoise son similares en todos los países del mundo como se desprende de los trabajos de Frigerio y Gomez (1986), Prass (1986), Meier (1986), Ivanov y col. (1986), Bori (1986), Bidan y col. (1986), Danilatos y Voudoritsoukaula (1986), Kerenyi (1986), Usseglio-tomasset (1986), etc. En

todos los casos los vinos base se obtienen con una elaboración muy cuidadosa, tienen una acidez total alta, de 4,5 a 6 g/l en ácido sulfúrico (Suarez y col., 1979; Bidan y col., 1986) y pH comprendido entre 3,0 y 3,3 (Bidan y col., 1986; Ussaglio-Tomasset, 1986).

En España, la reglamentación existente (B.O.E., 1972) establece las variedades de uva que pueden ser utilizadas en la elaboración de vinos espumosos: Macabeo, Xarello, Parellada, Monastrell, Garnacha y Malvasía riojana. De entre estas, las tres primeras son las utilizadas mayoritariamente.

Las distintas variedades de uva se vinifican por separado pero el vino base se obtiene por mezclas de vinos o "coupages", en las proporciones que determina cada elaborador. Esa práctica es común en todos los países del mundo excepto en la región del Champagne donde algunos tipos de espumosos se elaboran exclusivamente con la variedad Chardonnay y en la región de Alsace donde se hace lo mismo con la variedad Pinot Blanc.

La reglamentación española fija, además, las siguientes características analíticas que debe reunir el vino base para la elaboración de cava:

Grado alcohólico entre 9,5 y 11,5°.

Acidez de titulación en ácido sulfúrico, de 3,5 a 6 g/l.

Extracto seco no reductor de 12,5 a 20 g/l.

Acidez volátil en ácido acético, inferior a 0,7 g/l.

SO₂ libre, inferior a 20 mg/l y

SO₂ total, inferior a 170 mg/l.

El resto de las variables analíticas no están reglamentadas. Las características que debe reunir un vino base dependen de muchos factores, pero se pueden resumir (Hidalgo, 1983) en:

- Color muy pálido por la tendencia del mercado,
- Aromas afrutados que recuerden a las variedades de uva con que han sido elaborados,
- Gusto fresco, afrutado y algo ácido,
- Azúcar residual lo más bajo posible.

El conjunto de variables analíticas puede servir como criterio de calidad y, en especial, para prever las posibilidades de envejecimiento del producto (Bidan y col., 1986).

Ya nos hemos referido anteriormente a la participación de las sustancias de elevado peso molecular en la precipitación del KHT. De entre todas éstas, en el caso de los vinos blancos, las proteínas parecen ser las máximas responsables de la ralentización e inhibición de la precipitación de esta sal.

Estas hipótesis parecen confirmarse por el estudio del comportamiento de vinos blancos respecto a la precipitación del KHT. Sin embargo, la cantidad total de proteína no parece ser un índice que permita predecir dicho comportamiento. Factores tales como la naturaleza de las proteínas, su grado de asociación o desnaturalización parecen ser claves a la hora de conseguir una correcta estabilización. Por este hecho y por ser la fracción menos conocida de los mostos y vinos, se ha llevado a cabo su estudio que es el primero que se realiza sobre las proteínas de los vinos españoles.

Los datos tanto cualitativos como cuantitativos de las proteínas presentes en mostos y vinos, que aparecen en la bibliografía son muy

disparas. La preparación de la muestra y las condiciones elegidas para la realización de los análisis electroforéticos o cromatográficos influyen en los resultados obtenidos por lo que hemos considerado conveniente hacer un estudio de los trabajos realizados sobre este tema.

5.2 REVISIÓN DE LOS TRABAJOS REALIZADOS SOBRE LA FRACCIÓN PROTEICA EN MOSTOS Y VINOS.

Los primeros estudios sobre la fracción proteica de mostos y vinos datan de 1959 y se deben a Koch y Sajak. Estos autores comprobaron que las proteínas de estas muestras están constituidas por una mezcla heterogénea que puede separarse en función de sus propiedades fisicoquímicas (relación carga/masa). Posteriormente, Moretti y Berg (1965) pusieron de manifiesto que no existe relación entre la cantidad total de proteína y los problemas que su presencia origina, por lo que es necesario un estudio cualitativo de las mismas.

Una de las principales dificultades en el estudio de las proteínas en este tipo de muestras es la pequeña proporción en que se encuentran. Esto hace que no se disponga de un método estandarizado para su análisis cuantitativo y que los valores dados por los distintos autores sean muy diferentes. Esta circunstancia ha sido señalada por Cordonnier (1966) y Yokotsuka y col. (1977), quienes llaman la atención sobre resultados que difieren en dos órdenes de magnitud, que difícilmente pueden ser explicados por diferencias climáticas, regionales o tecnológicas.

Los parámetros que se pueden determinar en las proteínas están en función de la técnica utilizada. Las técnicas analíticas empleadas en

la caracterización de las proteínas de mostos y vinos son las empleadas habitualmente en el campo de la bioquímica de los alimentos: cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, ultracentrifugación, electroforesis en papel y en gel, con y sin agentes desnaturalizantes, isoelectroenfoque y cromatografía de líquidos de alta eficacia.

La Tabla 5.1 resume las principales estudios realizados sobre las proteínas de los mostos y vinos. Se ha prestado una especial atención al método de aislamiento y purificación, a la técnica analítica empleada y a la finalidad perseguida.

5.2.1 Factores de los que depende el contenido en proteína de mostos de uva y vinos.

En la uva verde no hay proteínas. Aparecen durante la maduración y pasan a formar parte del mosto en el prensado.

La cantidad de proteínas presentes en el mosto, esta influida por factores tales como la variedad, el clima, el grado de madurez, el suelo y por las condiciones en que se realiza el prensado, sin poder precisar cual es la más decisiva.

Durante el proceso de elaboración del vino, el contenido en proteína se ve afectado fundamentalmente por tres factores: La aparición del alcohol, la temperatura y los tratamientos realizados en bodega. En un principio se pensó que las levaduras responsables de la fermentación, aumentaban por autólisis el contenido en proteína de los vinos (Moretti y Berg, 1965), pero posteriormente Bayly y Berg (1967) y Colagrande y Silva (1981) ponen de manifiesto que únicamente

Tabla 5.1 Resumen de los principales trabajos sobre la fracción proteica de mostos y vinos que aparecen en la bibliografía.

NUESTRA MUESTRA	PREPARACION DE LA MUESTRA	TECNICA DE SEPARACION	DETECCION	FINALIDAD	REFERENCIA
Mostos y vinos	Precipitación con $50\%(NH_4)_2$	Electroforesis papel		Efecto trat. bentonita Koch y Efecto trat. calor Diferenciación varietal	Sajak (1959)
Mostos y vinos	Diálisis	PAGE tubos Ultracentrifugación	línción negro salido	Estabilidad vinos	Moretti y Berq (1965)
Mostos y vinos	Diálisis	PAGE tubos Sephadex G75 DEAE celulosa	línción negro salido Absorb. 280 y 280 nm	Estabilidad vinos	Devi y Berq (1967)
Zumos	Precipitación con $50\%(NH_4)_2$ Ultrafiltración	Electroforesis papel PAGE tubos Sephadex G75 TLC-Sephadex G75, 100, y 200 DEAE celulosa	línción negro salido. reactivo de Schiff y negro sudán Absorbancia 280 nm	Caracterización proteínas	Radola y col. (1967)
Mostos y vinos	Ultrafiltración Sephadex G25, 50 y 100	PAGE	línción negro salido		Fauillat y col. (1972)
Zumos	Ultrafiltración	IEF columna TLC-IEF Electroforesis papel PAGE tubos	pH del eluido línción con Azul Coomassie	Caracterización proteínas	Radola y Richer (1972)
Uvas	Extracción con acetona	IEF		Identificación enzimas y medida actividades enzimáticas	Draewert y Muller (1973)
Vinos	Aplicación directa	Sephadex G25	280 nm	Efecto trat. bentonita Ziemelis (1973)	
Uvas	Extracción acetona	IEF y electroforesis		Diferenciación variedades y determinación isoenzimas	Draewert y Burg (1974)
Hojas de vid y uvas	Homonización, centr. y extracción almidón	Electroforesis gel	Actividad enzimática	Identificación isoenz. Dif. varietal	Wolfin (1976)

Tabla 5.1 (continuación)

Mostos	Sephade: G25	IEF	Caracterización	Amells (1977)
Mosto, vino v. med. sint.	Precipitación con EtOH	Sephadex 6B Biogel A50	Estudio coloides mostos, vinos y células por la. af.	Imedio- Iomasset y Di Stefano (1977)
Zumos, mostos y vinos	Dialisis + precip. TCA + ultrafiltr.	PAGE-SDS, tubos IEF	Caracterización proteínas	Volotaula y col. (1977)
Vinos espumosos	Ultrafiltración	Sephade: G10 y 25	280 y 254 nm	Evolut. en el proceso charmat y champenois, en el trat. térmico y crianza
Mostos y vinos	Ultrafiltración y dialisis	HPLC	280 nm	Lyon y col. (1981)
Mostos y vinos	IEF, FAGE y IEF + FAGE-SDS			Influencia de los trat. tecnológicos
Mostos y vinos	Dial., precip. TCA y extrac. acetona	Sephade: G25 DEAE-Sephade: A50		Turbidez proteína-tenino
Mostos y vinos	Aplicación directa	HPLC	285 nm	Caracterización proteínas
Uvas, zumos y vinos	Lambio iónico y FVP	LDS-PAGE IEF + LDS-PAGE Electroblotting	Tinc. Azul Coomassie	Dubourdieu y col. (1986)
Uvas	Precip. 504(RH4)2 + dialisis	IEF + FAGE-SDS	RM3AQ	Ilu y Heatherbell (1987)
Mostos	Sephade: G100	HPLC	214 nm	Caracterización proteínas
Mostos	Dialisis	PAGE, FAGE-SDS y IEF	Tinción Azul Coomassie	Interesse y col. (1987)
Mostos	Dialisis	PAGE		Correa y col. (1988)
Mostos	Dialisis		Tinción Azul Coomassie	González-Lara y col. (1989)

excretan péptidos y que participan en la degradación de las proteínas existentes.

De los tratamientos realizados en bodega que afectan al contenido en proteína, el más importante es el tratamiento con bentonitas. este tratamiento se utiliza para reducir el contenido en proteína del vino y los riesgos que su presencia origina. Las bentonitas, por su elevada capacidad de intercambio catiónico, eliminan por adsorción las proteínas del vino que están cargadas positivamente (Brugirard, 1979).

El efecto de las bentonitas sobre las proteínas ha sido estudiado ampliamente desde hace muchos años (Koch y Sajak, 1959; Moretti y Berg, 1965; Bayly y Berg, 1967; Brugirard, 1979; etc.) y se sabe que pueden llegar a eliminarlas totalmente.

5.2.2 Aislamiento y cuantificación de la proteína total.

El contenido en proteína de los alimentos se puede estimar a partir de la medida del nitrógeno total, pero en el caso del mosto y del vino en el que hay una gran cantidad de aminoácidos libres y péptidos, los valores que se obtienen son completamente erróneos.

La presencia de polifenoles en las muestras impide que se pueda aplicar el clásico método de Lowry (1951) de determinación de proteína, por lo que se han buscado alternativas a este método. En ocasiones, se ha utilizado el método de Biuret (Bayly y Berg, 1967; Interesse y col., 1987), basado en la reacción característica del enlace peptídico con sulfato de cobre en medio alcalino, pero tiene el inconveniente de la interferencia de los péptidos lo que da lugar a valores excesivamente altos. La fiabilidad de este método depende de la purificación previa de la muestra.

Un método habitual de purificación de la muestra para el estudio de las proteínas es la utilización de agentes precipitantes y la posterior separación por centrifugación. En este caso, la proteína se calcula multiplicando el contenido en nitrógeno total del precipitado por 6,25. Es decir, se supone que el contenido medio en nitrógeno total de las proteínas de los mostos es del 16 %.

Cualquier agente precipitante utilizado debe mantener intacta la estructura de la proteína si después se desean realizar estudios sobre su naturaleza. Entre los de uso más corriente se pueden destacar los siguientes: sulfato amónico (Koch y Sajak, 1959; Laminkara, 1987); ácido fosfomolibdico (Moretti y Berg, 1965; Bayly y Berg, 1967); etanol (Usseglio-Tomasset y Di Stefano, 1977; Villetaz y col., 1982); y acetona (Drawert y Muller, 1973; Drawert y Gorg, 1974). La utilización del etanol y de la acetona presenta como inconveniente el no ser selectivo de las proteínas precipitando también otros coloides como polisacáridos y pectinas. El sulfato amónico y el ácido fosfomolibdico parecen ser más específicos, pero necesitan ser eliminados si se desea realizar análisis cualitativos. En todos los casos, sobre las proteínas se adsorben sustancias de menor peso molecular que interfieren en los análisis (Tyson y col. 1981; Interesse y col. 1987).

Koch y Sajak (1959) por el método de Biuret dan valores de proteína en vinos algo menores de 200 mg/l. Bayly y Berg (1967) con una modificación del método de Biuret, encuentran valores comprendidos entre 20 y 260 mg/l para mostos de uva blanca y de 30 a 275 mg/l para vinos también de uva blanca.

Un método utilizado para la purificación de la muestra con fines preparativos, es la diálisis frente a distintos solventes, que pretende evitar las interferencias debidas a sustancias de pequeño peso molecular (Moretti y Berg, 1965; Bayly y Berg, 1967; Yokotsuka y col., 1983; Correa y col., 1988). La principal ventaja de este método es la de permitir controlar el tamaño molecular mínimo de las sustancias retenidas utilizando membranas de distintas características. La no especificidad del método justifica que se utilice en combinación con otras técnicas (Radola y Richter, 1972; Yokotsuka y col., 1977 y 1983). Sin embargo parece que por diálisis se retienen compuestos de bajo peso molecular que absorben en el UV y puede interferir en un análisis posterior y que pueden ser separados por cromatografía de exclusión molecular (Tyson, 1981, Yokotsuka 1983).

Diemaier y col. (1961) son los primeros en utilizar la ultrafiltración para el aislamiento de la fracción proteica, técnica similar a la diálisis pero considerablemente más rápida. Radola y Richter (1972) comparan los resultados de este método con los obtenidos por combinación de la precipitación con sulfato amónico seguida de diálisis y no encuentran diferencias significativas entre ambos. Posteriormente, la ultrafiltración ha sido utilizada por Feuillat y Bergeret (1972), Colagrande y Silva (1981), Tyson y col. (1981) y Colagrande y Silva (1987).

Feuillat y Bergeret (1972) determinan el nitrógeno proteico como el nitrógeno de la fracción excluida por cromatografía en Sephadex G-25 (límite de exclusión 5000 daltons). Encuentran que el nitrógeno

proteico representa el 1,7 % del nitrógeno total, lo que supone que la cantidad de proteína es de unos 10,5 mg/l.

Según Anelli (1977) la cantidad de proteína, que valora como suma de los aminoácidos en la fracción proteica separada por Sephadex G-25, está comprendida entre 3,0 y 14,7 mg/l (aproximadamente el 2% del nitrógeno total).

Yokotsuka y col. (1977) valoran la proteína como suma de los aminoácidos en el precipitado obtenido con ácido tricloroacético (TCA) en mostos y vinos dializados. Estos autores encuentran que el contenido en proteína está comprendido entre 1,5 y 9,0 mg/l para mostos y entre 0,1 y 0,4 mg/l para vinos.

Yokotsuka y col. (1978) proponen la utilización del Negro de Amido 10B para valorar la cantidad de proteína presente en zumos de distintos vegetales, entre ellos, los mostos y en los vinos. Precipitan la proteína, antes de hacer su determinación, con TCA o con ácido perclórico (PCA). Estos autores comparan este método con el que resulta de calcular la cantidad de proteína, como suma de los aminoácidos después de la hidrólisis de la muestra dializada y los resultados son similares.

Sommers y Ziemelis (1973) proponen el empleo de la cromatografía de exclusión molecular a través de Sephadex G-25 para determinar el contenido en proteína de vinos blancos, por medida de la absorción a 280 nm del pico que aparece en el volumen de exclusión. Este método se basa en la baja contribución de los compuestos fenólicos al espectro UV de los vinos blancos (Sommers y Ziemelis, 1972). El método necesita una calibración previa que llevan a cabo con albúmina bovina (BSA). Los resultados obtenidos por estos autores, entre 100 y 320 mg/l en

vinos, no son muy diferentes que los obtenidos por otros ~~autores~~ por aplicación del método de Biuret (Koch y Sajak, 1959; Bayly y Berg, 1967).

Tyson y col. (1981) e Interesse y col. (1987) determinan la proteína total por un método de detección similar al de Sommers y Ziemelis (1973) pero utilizando una columna de cromatografía de líquidos de alta eficacia. Dubordieu y col. (1986) también usan la cromatografía de líquidos de alta eficacia para la determinación de proteína, midiendo la absorción a 225 nm., encontrando en el volumen de exclusión otras sustancias coloidales como polisacáridos que cuantifican con métodos específicos. Los valores totales de proteína dados por Dubordieu y col. (1986) de 346 mg/l y los de Interesse y col. (1987) de 346 mg/l nos parecen algo elevados debido probablemente a la interferencia de otros compuestos que absorben en el ultravioleta.

Bradford (1976) ha propuesto la utilización del Azul Brillante de Coomassie G-250 para cuantificar la cantidad total de proteína presente en una solución. Este reactivo ha tenido una gran aceptación en todos los campos llegando a ser comercializado en el sector de los vinos. Ha sido empleado directamente sobre la muestra por Hsu y Heatherbell (1987), que dan valores entre 58,2 y 77,1 mg BSA/l para mostos y entre 29,4 y 41,3 mg BSA/l para vinos, e Interesse y col. (1987) que dan valores de 535 mg/l para mostos. Estos últimos autores comparan este método con el Biuret sin encontrar grandes diferencias. En nuestro laboratorio (Correa y col., 1988) se ha aplicado sobre muestras de mostos dializados y concentrados obteniéndose valores comprendidos entre 1,0 y 5,0 mg BSA/l. La diferencia encontrada entre

la aplicación del método a la muestra dializada y concentrada y a la muestra directamente así como la coincidencia con el método de Biuret, que incluye a los péptidos, hace pensar en la interferencia de estos últimos compuestos.

5.2.3 Caracterización de las proteínas.

El estudio cualitativo de las proteínas de la uva se ha abordado para determinar la posibilidad de utilizarlo como criterio de caracterización varietal y para intentar comprender mejor los mecanismos que conducen a la formación de turbidez en el producto embotellado.

Sin lugar a dudas, la electroforesis es la técnica que mayor número de datos ha aportado acerca de la naturaleza de las proteínas presentes en los mostos y vinos, seguida en orden de importancia por el isoelectroenfoque.

La electroforesis es una técnica que separa las distintas fracciones proteicas presentes en una muestra en función de su densidad de carga. Se puede realizar con la proteína tal y como se presenta en la muestra (electroforesis sin agentes desnaturizantes), o desnaturizada (electroforesis con agentes desnaturizantes). En este último caso, la densidad de carga es proporcional al peso molecular.

Los parámetros experimentales de los que depende la resolución obtenida son, principalmente, el soporte utilizado, el sistema tampón y la intensidad de campo eléctrico que hace migrar las muestras y el método de tinción utilizado que puede provocar la difusión de las bandas separadas. La comparación de los resultados experimentales

obtenidos por los distintos autores por variación de alguna de estas condiciones no siempre es posible (Radola y Richter, 1972).

El isoelectroenfoque (IEF) separa las fracciones proteicas atendiendo a su punto isoelectrico o isoiónico (pI), es decir, el pH al cual las cargas negativas igualan a las positivas.

Uno de los primeros trabajos de aplicación de la electroforesis sin agentes desnaturalizantes a muestras de vinos, es el de Koch y Sajak (1959) que utilizan la electroforesis en papel. Llegan a separar distintas bandas y encuentran diferencias que atribuyen a la variedad. La electroforesis sobre papel para el estudio de la fracción proteica del mosto ha sido utilizada también por Radola y Richter (1972) llegando a separar de 6 a 8 bandas en muestras de mosto, sin hallar diferencias cualitativas entre las cinco variedades de uva estudiadas.

Actualmente la electroforesis en papel ha caído en desuso en favor de la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) ya sea en tubos o en placas (Moretti y Berg, 1965; Bayly y Berg, 1967; Laminkara, 1987; Hsu y Heatherbell, 1987; Correa y col. 1988), con la que se consigue mayor resolución. Esta mayor resolución es debida a que el gel de poliacrilamida permite controlar el tamaño de poro, poniendo un impedimento estérico a la migración de las proteínas.

En 1965, Moretti y Berg, separan hasta 5 fracciones en muestras de vino y encuentran que las variaciones debidas a la madurez, cosecha y procedencia de la uva son tan grandes que no se puede encontrar un patrón característico de la variedad.

En 1967, Bayly y Berg, llegan a separar 10 fracciones en mostos y un número mayor en vinos, coincidiendo con Moretti y Berg (1965) en la

dificultad de encontrar un patrón característico de la variedad, debido a la influencia de otros factores.

Radola y Richter (1972) utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida para el estudio de mostos procedentes en su mayoría de la misma área geográfica, Austria, llegan a separar hasta 15 fracciones y encuentran perfiles característicos para cada una de las variedades estudiadas. Estas diferencias parecen estar en la proporción relativa de las distintas fracciones y no en la existencia de fracciones características. Resultados similares se han obtenido en nuestro laboratorio (Correa y col. 1988; Gonzalez-Lara y col., 1989), aplicando la misma técnica a mostos españoles. Las diferencias encontradas por Radola y Richter (1972) por electroforesis, no las detecta por isoelectroenfoque y aunque se insinúa la posibilidad de la existencia de bandas características de la variedad, no se encuentran en cantidad suficiente para su caracterización y los resultados no son concluyentes.

Por isoelectroenfoque, se separa mayor número de fracciones que por electroforesis. En la mayoría de las variedades se observa un predominio de las proteínas ácidas, con pI comprendido entre 3,5 y 6,0 (Radola y Richter, 1972; Drawert y Muller, 1973; Drawert y Gorg, 1974; Correa y col. 1988), aunque existan algunas variedades que presentan fracciones de pI menor como la Malvasia (Anelli, 1977) o mayor como la Muscadine (Laminkara, 1987). Drawert y Gorg (1974) y Yokotsuka y col. (1977) han utilizado con éxito esta técnica para la caracterización varietal de mostos de uva.

La aplicación de la electroforesis con agentes desnaturalizantes a muestras de mostos y vinos es algo posterior, siendo el dodecil

sulfato de sodio (SDS) el agente desnaturalizante de uso más extendido. El peso molecular de las proteínas mayoritarias de los mostos y de los vinos, según la mayoría de los autores, parece estar comprendido entre 20000 y 30000 daltons. sin embargo se han detectado proteínas fuera de este rango. Yokotsuka y col. (1977) detectan proteínas de pesos moleculares comprendidos entre 11000 y 28000 daltons, Gorg y col. (1982) entre 10000 y 68000 daltons, Laminkara (1987) entre 14000 y 100000 daltons, Hsu y Heatherbell (1987) entre 11000 y 65000 daltons, y Correa y col. (1988) entre 15500 y 43000 daltons.

El rango de pesos moleculares de las proteínas mayoritarias es similar al obtenido por cromatografía de líquidos de alta eficacia por Dubodieu y col. (1986) e Interesse y col. (1987) (entre 25000 y 30000 daltons) y por ultracentrifugación por Moretti y Berg (1965) (entre 18000 y 23000 daltons). No ocurre lo mismo con el obtenido por cromatografía en columna sobre Sephadex G-100 por Feuillat y Bergeret (1972), que encuentran tres fracciones de pesos moleculares de 150000, 50000 y 8000 daltons siendo esta última mayoritaria. Sin embargo, no se puede olvidar que en cromatografía sobre geles de Sephadex, el peso molecular no es el único factor de separación, teniendo mucha importancia la forma de las proteínas y las interacciones de tipo hidrófobo entre la muestra y el gel.

Usseglio-Tomassiet y Di Stefano (1977) determinan por cromatografía en columna sobre Sepharosa 6B el peso molecular de proteínas asociadas a otras sustancias coloidales (polisacáridos y pectinas fundamentalmente) formando complejos de peso molecular muy elevado (desde 15000 hasta 200000 daltons). Sólo el 36,5 % de estas

proteínas está comprendido entre 15000 y 50000 daltons. Valores parecidos sólo han sido encontrados en muestras de uva (Hsu y Heatherbell, 1987).

Respecto a la composición en aminoácidos de las distintas fracciones, Koch y Sajak (1959) no diferencian unas de otras. Anelli (1977) y Ough y Anelli (1979) relacionan el pI de las proteínas y su composición en aminoácidos en uvas blancas y tintas respectivamente. Yokotsuka y col. (1977) no encuentran diferencias destacables entre la composición en aminoácidos de las proteínas de distintas variedades de uva. Estos autores destacan el mayor contenido en glicocola y prolina de las proteínas de los vinos respecto a los mostos.

Yokotsuka y col. (1977) ha detectado diferencias varietales en el peso molecular de las proteínas de mostos, así como Correa y col. (1988) quienes también encuentran diferencias con la maduración.

Recientemente se ha empezado a aplicar la electroforesis bidimensional (PAGE-SDS combinada con IEF), a muestras de mostos y vinos (Gorg y col., 1982; Hsu y Heatherbell, 1987; Laminkara, 1987). Es una técnica que puede aportar mucha información sobre la naturaleza de las proteínas presentes en los mostos y vinos.

5.2.4 Estabilidad de las proteínas de los mostos y de los vinos.

Parte de las proteínas, dada su naturaleza coloidal, se mantienen tanto en el mosto como en el vino, en suspensión. Al pH del mosto y del vino están cargadas positivamente y mantienen con el resto de los iones un delicado equilibrio electrostático (Brugirard, 1979).

Tanto en la precipitación espontánea como en la provocada por acción del calor, van acompañadas de otras sustancias reductoras, taninos y compuestos inorgánicos cuyo papel no ha sido clarificado.

El efecto de la estabilidad de las proteínas se estudia por su resistencia a la temperatura, aproximadamente 42°C, por un período de tiempo no inferior a las 24 horas. Esta temperatura provoca la desnaturalización y consiguiente precipitación de las proteínas. Se considera que un vino que permanece estable después de este tratamiento no se enturbiará una vez embotellado.

El efecto del calor no es el mismo para todas las proteínas. Moretti y Berg (1965) estudiando la estabilidad de los vinos frente al calor y la influencia de la temperatura sobre distintas fracciones, encuentran que una, de las 4 que separan, es la más afectada por el calor pero que el parámetro determinante es la proporción relativa de ésta respecto a las demás.

Bayly y Berg (1967) sugieren que esta precipitación por el calor es debida a que la desnaturalización pone al descubierto grupos cargados, rompiendo así el equilibrio electrostático y provocando la floculación. Estos autores, por cromatografía de intercambio iónico, separan 4 fracciones proteicas resultando ser más estables las de menor carga.

El hecho destacado por todos los autores es la importancia de la carga de las proteínas en los mecanismos de precipitación, por lo que puede considerarse a la electroforesis como la técnica idónea para el estudio de las proteínas de mostos y vinos. También es de gran importancia el conocimiento de la carga de las proteínas para explicar

su participación en la inhibición de la precipitación del KHT (capítulo 4).

Los estudios acerca de la fracción proteica de mostos de uva españoles, se limitan a los efectuados en nuestro laboratorio (Correa y col., 1988; Gonzalez-Lara y col., 1989) en los que se ha visto que el estudio de la fracción proteica puede ser empleado como criterio de caracterización varietal. Las proteínas de los mostos de las variedades destinadas a la elaboración de cavas no han sido estudiadas, ni tampoco existen datos sobre la fracción proteica presente en vinos españoles, por lo hemos abordado su estudio.

5.3 MATERIALES Y METODOS.

5.3.1 Muestras.

Mostos y vinos varietales de las variedades: Macabeo, Xarello, Parellada y vinos de la variedad Chardonay.

5.3.2 Grado alcohólico.

Se valora el contenido en etanol por oxidación con dicromato potásico en un destilado de vino.

5.3.3 Acidez total.

Se determina por volumetría con NaOH 0,1 N hasta pH = 7. El resultado se expresa en g/l de ácido tartárico.

5.3.4 Acidez volátil.

Valoración con NaOH 0,1 N de los ácidos volátiles presentes en el vino separados por arrastre de vapor. El resultado se expresa en g/l de ácido acético.

5.3.5 Extracto seco.

Se determina por desecación en baño maria a 100°C durante 6 horas.

5.3.6 Cenizas.

Incineración del extracto seco del vino a 500-550°C.

5.3.7 pH.

Medida con un pH-metro Orion Research modelo 601 I.

5.3.8 Acido tartárico.

Según el método de Vidal Blouin (1978), basado en reacción colorimétrica con metavanadato amónico y lectura de la absorbancia a 500 nm.

5.3.9 Acido málico.

Determinación enzimática según Boehringer Mannheim (1975) basada en la oxidación del L-malato por L-MDH en presencia de EAD. La cantidad de NADH formado que se ha medido a 340 nm. es proporcional a la cantidad de L-malato en la muestra.

5.3.10 Acido láctico.

Determinación enzimática según Boehringer Mannheim (1975) basada en la oxidación del L-lactato por L-LDH en presencia de NAD. La cantidad de NADH formada que se ha medido a 340 nm. es proporcional a la cantidad de L-lactato en la muestra.

5.3.11 Fructosa.

Determinación enzimática según Boehringer Mannheim (1975) basada en la fosforilación mediante HK y ATP a F-6-P, paso a G-6-P mediante PGI y posterior oxidación por NADP. La cantidad de NADPH formada que se ha medido a 340 nm. es proporcional a la cantidad de fructosa en la muestra.

5.3.12 Glucosa.

Determinación enzimática según Boehringer Mannheim (1975) basada en la fosforilación mediante HK y ATP a G-6-P y oxidación por NADP. La cantidad de NADPH formada que se ha medido a 340 nm. es proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra.

5.3.13 Glicerina.

Determinación enzimática según Boehringer Mannheim (1971) que consiste en la fosforilación con ATP y GK a glicerol-1-fosfato con formación de ADP. El ADP con PEP y PK pasa a ATP y el PEP a piruvato. Este piruvato se reduce a lactato en presencia de NADH y LDH. La disminución en la densidad óptica a 340 nm. corresponde a la cantidad de NADH que ha desaparecido y es proporcional a la cantidad de glicerina presente en la muestra.

5.3.14 Polifenoles totales.

Reacción colorimétrica de los polifenoles con los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico (reactivo Folin Ciocalteu) y lectura de la absorbancia a 670 nm. (Singleton y Rossi, 1965). Los resultados se expresan como g/l de ácido gálico.

5.3.15 Intensidad de color.

Suma de las absorbancias a 420 y 520 nm. en cubetas de 10 mm de paso óptico.

5.3.16 Nitrógeno total.

Se ha seguido el método Kjeldahl, basado en la transformación del nitrógeno en sulfato amónico por ataque con ácido sulfúrico concentrado a ebullición, en presencia de un catalizador, seguida de destilación en medio alcalino recogiendo el destilado en ácido bórico. El amonio se valora con ácido clorhídrico 0,1 N.

5.3.17 Prolina.

Reacción colorimétrica con ninhidrina y lectura de la absorbancia a 515 nm. (Ough, 1969).

5.3.18 Aminoácidos libres.

Se han determinado por cromatografía de líquidos de alta eficacia de los OPA-derivados según el método descrito por Cáceres (1987). Se ha utilizado un equipo Waters formado por 2 bombas M-6000 A, un controlador M-720, módulo de compresor radial ECM-100, un inyector U6k y un detector de fluorescencia M-420 AC (λ_{exc} = 340 nm., λ_{em} = 425 nm.). Columna Radial-Pak C-18, 10 micras.

Las condiciones cromatográficas han sido: Eluyente A: Metanol:fosfato sódico 0,01 M, pH = 7,3: tetrahidrofurano (19:80:1). Eluyente B: Metanol:fosfato sódico 0,01 M, pH = 7,3 (80:20). Gradiente lineal: 0 min (0 % B, 1,5 ml/min); 6 min (15 % B, 1,5 ml/min); 11 min (15 % B, 1,5 ml/min); 16 min (30 % B, 1,5 ml/min); 20 min (40 % B, 1,5 ml/min); 32 min (80 % B, 1,3 ml/min).

5.3.19 Preparación de la muestra para el estudio de la fracción proteica.

100 ml de mosto se dializan con membrana de tamaño de corte de 3500 daltons frente a H₂O MilliRO (Millipore Corporation, Bradford, USA) a 4°C durante 48 horas. Posteriormente se concentran introduciendo la bolsa de diálisis en soluciones de polietilenglicol 20 M. hasta un volumen final de 2 ml..

650 ml. de vino se concentran en el rotavapor a 40°C hasta un volumen aproximado de 100 ml., se centrifuga a 12000 rpm 20'. Se dializan y concentran en las mismas condiciones que los mostos hasta un volumen final de 5 ml..

5.3.20 Proteína total.

Se ha seguido el método Bradford (1976) basado en la reacción colorimétrica entre la proteína y el Azul Brillante de Coomassie G-250, y lectura de la absorbancia a 595 nm. sobre la muestra dializada y concentrada. Los resultados se expresan en mg BSA/l.

5.3.21 Electroforesis sobre gel de poliacrilamida sin agentes desnaturalizantes.

Se ha seguido el método de Hillier (1976) empleando placas de 170x130x0,7 mm. La composición del gel ha sido T = 9,4 % y C = 4,25 %. Las soluciones tampón utilizadas han sido tris-HCl pH = 8,9 para la preparación del gel y Tris-Glicina pH = 8,3 para los electrodos. La cantidad de la muestra aplicada ha sido de 10 µl..

Las placas se han revelado con Azul brillante de Coomassie G-250, según Blakesley y Boezi (1977), cuya principal característica es que no necesita destañado.

5.3.22 Electroforesis sobre gel de poliacrilamida con agentes desnaturalizantes (SDS).

Se ha realizado según el método de Laemmli (1970) con un gel de concentración T = 5 % y C = 1,4 % y un gel de resolución de T = 10 % y C = 2,7 %. La desnaturalización de la muestra se realizó por calentamiento a 100°C durante 5 minutos de la misma junto con un tampón de la siguiente composición: 0,0625 M de Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 5% β-mercapoetanol, 10 % glicerol y 0,002 % de azul de bromofenol (Hames, 1981), en cantidad suficiente para que la relación SDS/proteína fuese superior a 3. La cantidad de muestra aplicada fue de 20 µl. Para el revelado se ha seguido el protocolo descrito por Hames (1981), empleando como colorante Azul Brillante de Coomassie R-

250 en una solución de agua:metanol:ácido acético (5:5:2) durante 12 horas y para el destefido una solución de agua:alcohol isopropílico:ácido acético (775:125:100) durante 48 horas.

Para el calibrado de pesos moleculares, se ha utilizado un kit de Pharmacia Fine Chemicals (Ref.: 10C-010-01) que contiene las siguientes proteínas: Fosforilasa b (PM = 94000 daltons), Inhibidor de la tripsina de soja (PM = 21000 daltons), α -lactoalbúmina (PM = 14000 daltons).

5.3.23 Isoelectroenfoque.

Se ha utilizado un aparato LKB Multiphor 2117 y una fuente de refrigeración 2219 Multitemp II. El soporte empleado ha sido un gel de poliacrilamida de 55x40x0,25 mm. preparado en el laboratorio según el método descrito por Alonso y Gascó (1987) de composición T = 7,5 % y C = 3 %, con un gradiente de pH de 3,5 a 9,5.

Las condiciones utilizadas han sido: preenfoco a 0,7 V, 15 mA y 300 V durante 30 minutos y después de la colocación de la muestra enfoque de 80 minutos a 1,2 V, 15 mA y 700 V, en ambos casos a potencia constante y 5°C de temperatura.

El pH se ha medido a intervalos de 1 cm sobre la superficie del gel con un electrodo de superficie LKB Multiphor Electrode 2117-111, calibrado a 5°C.

Para la tinción se ha utilizado Azul Brillante de Coomassie aplicando el método de Blakesley y Boezi (1977).

5.4 RESULTADOS Y DISCUSION.

5.4.1 Características analíticas de los vinos base utilizados en la elaboración de cava.

El producto mayoritario en el vino después del agua es el alcohol. Se produce en el metabolismo de los azúcares por las levaduras durante la fermentación. Un grado alcohólico bajo conduce a un vino cava de espuma débil y poco persistente y una graduación alta puede ocasionar problemas para completar la segunda fermentación (Bidan, 1974). El *grado alcohólico* de las muestras analizadas (Tablas 5.2 a 5.5) oscila entre 9,2 y 12,5°. Una mezcla de estos vinos podría conducir sin dificultad a un vino base que cumpliera con los requisitos reglamentarios.

Entre los países comunitarios parece existir cierta tendencia (Bidan y col., 1986; Usseglio-Tomasset, 1986) a legislar el porcentaje de grado alcohólico adquirido en la segunda fermentación sobre el total del producto terminado.

La *acidez total* expresa, como se indicó en el capítulo 1. el contenido total en ácidos del vino, salificados y sin salificar por lo que no da idea del carácter ácido del vino y debe ser completado con el valor del pH. La tendencia más extendida entre los elaboradores es procurar una acidez total alta, dentro de los límites marcados por el reglamento.

La acidez total es una variable analítica cuya corrección está permitida por el Estatuto y se practica cuando el elaborador lo considera conveniente. En nuestro país se corrige por adición de ácido tartárico.

En las Tablas 5.2 a 5.5 se expresa la acidez total en gramos de ácido tartárico por litro. La equivalencia con gramos de ácido sulfúrico por litro se obtiene multiplicando por 0,653. El rango de acidez total para estos vinos es de un máximo de 8,25 g/l y un mínimo de 5,54 g/l de ácido tartárico con valores medios de 6,77 g/l para la variedad Parellada, 7,15 g/l para la variedad Macabeo y 6,25 g/l para la variedad Xarello. Estos vinos son algo más ácidos que los elaborados con otras variedades de uvas blancas españolas estudiados por Reglero (1985), que obtiene un valor medio de 5,22 g/l.

La *acidez volátil* expresa el contenido en ácidos volátiles, fundamentalmente ácido acético, que como producto secundario de la fermentación alcohólica siempre está presente. No obstante se procura que sea lo más baja posible. Los vinos analizados presentan valores de acidez volátil comprendidos entre 0,10 y 0,81 g/l y medias de 0,47 g/l para la variedad Parellada, 0,51 g/l para la variedad Macabeo y 0,29 g/l para la variedad Xarello.

El *extracto seco* representa al conjunto de sustancias no volátiles presentes en el vino, expresado en g/l. Parece tener influencia sobre la persistencia de la espuma en el producto terminado (Hidalgo, 1983). Estos vinos presentan valores comprendidos entre 12,30 y 20,38 g/l, con valores medios de 14,40 g/l para la variedad parellad, 14,82 g/l para la variedad Macabeo y 15,72 g/l para la variedad Xarello. Un extracto seco elevado parece ser una característica de la variedad Chardonay con la que se elabora en la región de Champagne (Bidan y col., 1986) y muy apreciada para la elaboración de cavas.

Tabla 5.2. Características analíticas de los vinos base de la variedad parellada utilizados para la elaboración de cavas. a) Datos obtenidos; b) Reglero (1995)

	X	S	Máx.	Mín.
Intensidad	10,3	6,77	5,80	5,42
Color (abs)	0,2	0,82	1,51	0,9
Fenoles totales (g ác. gál./l)	10,5	7,80	8,74	10,3
Glicerina (g/l)	9,9	5,54	4,12	10,3
Glucosa (g/l)	10,3	6,77	5,80	5,42
Fructosa (g/l)	0,2	0,82	1,51	0,9
Acido L(+) láctico (g/l)	10,5	7,80	8,74	10,3
Acido L(-) málico (g/l)	9,9	5,54	4,12	10,3
Acido Tartárico (g/l)	10,3	6,77	5,80	5,42
pH	0,2	0,82	1,51	0,9
Cenizas (g/l)	10,5	7,80	8,74	10,3
Extracto seco (g/l)	9,9	5,54	4,12	10,3
Acidez volátil (g ác. acét./l)	10,3	6,77	5,80	5,42
Acidez total (g ác. tartár./l)	0,2	0,82	1,51	0,9
Grado alcohólico (%v/v)	10,5	7,80	8,74	10,3

Tabla 5.3 Características analíticas de los vinos base de la variedad Macabeo utilizados para la elaboración de cavas. a) Datos obtenidos; b) Reglero (1985)

	a) n = 7				b) n = 10			
Intensidad				0,235				
Color (abs)				0,114				0,114
Fenoles totales				0,69				0,153
(g ác. gál./l)				0,12				0,082
Glicerina (g/l)				0,06				0,033
Glucosa (g/l)				0,22				0,201
Fructosa (g/l)				0,07				0,099
Acido L(+) láctico (g/l)				0,48				0,112
Acido L(-) málico (g/l)				0,87				0,082
Acido tartárico (g/l)				4,16				0,225
pH				3,13				0,016
Cenizas (g/l)				1,07				0,009
Extracto seco (g/l)				14,82				0,001
Acidez volátil (g ác. acét./l)				0,51				0,001
Acidez total (g ác. tartár./l)				7,15				0,001
Grado alcohólico (%v/v)				10,4				0,001
	X	1,1	0,00	0,25	X	10,7	6,02	0,40
	S	12,5	8,18	0,81	S	0,7	0,91	0,19
	Máx.	9,2	5,59	0,24	Máx.	12,1	7,74	0,82
	Mín.				Mín.	9,7	4,53	0,10

Tabla 5.4 Características analíticas de los vinos base de la variedad Xarello utilizados para la elaboración de cavas. a) Datos obtenidos; b) Reglero (1985)

	X	S	Máx.	Mín.
Intensidad Color (abs)	0,245	0,172	0,596	0,112
Fenoles totales (g ác. gál./l)	0,124	0,021	0,160	0,098
Glicerina (g/l)	6,08	1,09	7,68	4,91
Glucosa (g/l)	0,14	0,02	0,16	0,10
Fructosa (g/l)	0,16	0,03	0,19	0,09
Acido L(+) láctico (g/l)	0,50	0,44	1,37	0,20
Acido L(-) málico (g/l)	1,15	0,75	2,37	0,05
Acido Tartárico (g/l)	4,28	0,77	5,52	3,14
pH	3,13	0,16	3,39	2,94
Cenizas (g/l)	1,16	0,38	1,69	0,61
Extracto seco (g/l)	15,72	1,53	18,33	14,01
Acidez volátil (g ác. acét./l)	0,29	0,13	0,52	0,11
Acidez total (g ác. tartár./l)	6,25	2,43	8,25	6,45
Grado alcohólico (%v/v)	11,5	0,8	12,4	10,5

	X	S	Máx.	Mín.
Intensidad Color (abs)	0,161	0,046	0,249	0,031
Fenoles totales (g ác. gál./l)	0,143	0,03	0,194	0,035
Glicerina (g/l)	4,56	1,54	6,05	0,89
Glucosa (g/l)	0,07	0,03	0,11	0,03
Fructosa (g/l)	0,24	0,18	0,60	0,07
Acido L(+) láctico (g/l)	0,59	0,59	1,63	0,00
Acido L(-) málico (g/l)	1,28	0,87	2,19	0,03
Acido Tartárico (g/l)	3,47	0,72	4,62	2,25
pH	3,38	0,17	3,56	3,13
Cenizas (g/l)	1,01	0,11	1,18	0,83
Extracto seco (g/l)	13,16	1,55	15,51	11,26
Acidez volátil (g ác. acét./l)	0,39	0,16	0,76	0,24
Acidez total (g ác. tartár./l)	5,59	0,71	6,90	4,99
Grado alcohólico (%v/v)	11,6	0,7	12,9	10,2

Tabla 5. 5 Características analíticas de los vinos base de la variedad Chardonnay utilizados para la elaboración de cavas. a) lidos obtenidos; b) Reglero (1995).

Intensidad																
Color (abs)																
Fenoles totales (g ác. gál./l)																
Glicerina (g/l)																
Glucosa (g/l)																
Fructosa (g/l)																
Acido L(+) láctico (g/l)																
Acido L(-) málico (g/l)																
Acido Tartárico (g/l)																
pH																
Cenizas (g/l)																
Extracto seco (g/l)																
Acidez volátil (g ác. acét./l)																
Acidez total (g ác. tartár./l)																
Grado alcohólico (% v/v)																
a) n = 1	x	11,6	6,90	0,59	20,38	1,75	3,47	2,80	0,16	2,42	0,66	0,39	6,19	0,234	0,198	
b) n = 2	x	12,5	8,42	0,47	23,51	1,79	3,59	2,13	2,77	0,32	0,38	0,13	6,28	0,216	0,274	
Máx.		12,7	8,66	0,70	23,81	1,87	3,67	2,76	3,39	0,46	0,58	0,18	6,61	0,216	0,319	
Mín.		12,2	8,17	0,16	23,40	1,70	3,50	1,50	2,15	0,18	0,17	0,08	5,95	0,215	0,229	

Las cenizas del vino representan la fracción mineral que permanece después de la incineración a 500-550°C del extracto seco. Los valores encontrados en estos vinos oscilan entre 0,61 y 1,79 g/l con valores medios de 1,17 g/l para la variedad Parellada, 1,07 g/l para la variedad Macabeo y 1,16 g/l para la variedad Xarello.

El pH es una medida de la acidez del medio, esto es de la concentración de protones y, por tanto de la fracción de ácidos sin salificar. El pH óptimo se establece entre 3,0 y 3,3 (Bidan y col, 1986; Usseglio-Tomasset, 1986). Los vinos analizados tienen pH comprendidos entre 2,94 y 3,47 con valores medios de 3,11 para la variedad Parellada y 3,13 para las variedades Macabeo y Xarello.

La cantidad de azúcares reductores debe ser lo más baja posible, lo que se consigue procurando una primera fermentación lo más completa posible. Un alto contenido en azúcares reductores puede comunicar sabores defectuosos al cava terminado y produce precipitaciones difíciles de eliminar por adherirse al cristal de la botella (Bidan, 1974). Las Tablas 5.2 a 5.5 muestran el contenido en los azúcares reductores mayoritarios: glucosa y fructosa. Los valores medios inferiores a 1 pueden considerarse aceptables.

La glicerina es el producto mayoritario de entre los secundarios de la fermentación alcohólica. La presencia de glicerina confiere al vino sensación de suavidad. La formación de glicerina depende (Mareca, 1983) de las levaduras que realizan la fermentación, del pH y del contenido en anhídrido sulfuroso. Los vinos analizados tienen un contenido en glicerina comprendido entre 4,25 y 7,97 g/l con valores medios de 5,27 g/l para la variedad Parellada, 6,69 g/l para la variedad Macabeo y 6,08 g/l para la variedad Xarello.

El contenido en *polifenoles totales* para un vino base para la elaboración de cava según Usseglio-Tomassat (1986) ha de ser menor de 200 mg/l. Solo hay dos muestras que sobrepasan este valor, siendo los valores medios de 0,164 g/l para la variedad Parellada, 0,114 g/l para la variedad Macabeo y 0,124 g/l para la variedad Xarello.

El color de un vino se debe a los pigmentos que contiene, es decir (Riberau-Gayon y col., 1982) a los antocianos rojos y a los taninos amarillo-marrones. La suma de las absorbancias a 520 y 420 nm. es una expresión satisfactoria de la *Intensidad de color*. Estos vinos presentan valores de intensidad de color comprendidos entre 0,058 y 0,606 con valores medios de 0,182 para la variedad Parellada, 0,235 para la variedad Macabeo y 0,245 para la variedad Xarello.

De los *ácidos orgánicos* del vino, los mayoritarios son el ácido tartárico, el málico y el láctico.

La importancia del *ácido tartárico* ya ha sido comentada. Los valores medios para las distintas variedades no son muy diferentes, 4,28 g/l para la variedad Parellada, 4,16 g/l para la Macabeo y 4,28 g/l para la Xarello. La variedad Chardonnay presenta un valor algo menor, 2,80 g/l. Estos valores medios son inferiores a los reportados por Polo y col. (1986) como valor medio, 3,20 g/l, de 72 muestras de vinos blancos varietales españoles.

La proporción de *ácido málico y láctico* en un vino, depende de la extensión de la fermentación maloláctica. Los efectos de la transformación del ácido málico en láctico son disminuir la acidez del vino, suavizar su sabor, al ser el ácido láctico más suave al paladar que el ácido málico, y darle estabilidad microbiológica. Sobre la conveniencia de esta fermentación en vinos que vayan a ser elaborados

por el método champenoise, no existen criterios unificados, mientras en Francia se procura que se realice (Bidan y col., 1986), en otros países se pretende lo contrario (Usseglio-Tomasset, 1986; Meier, 1986). La mayoría de los vinos analizados por nosotros presentan un contenido en ácido málico algo mayor que en ácido láctico, es decir, no han tenido fermentación maloláctica o al menos no ha sido completa.

Un alto contenido en nitrógeno total ha sido destacado por Bidan y col. (1986) como una característica de la variedad Chardonnay. Esto se confirma con los datos de la Tabla 5.9 donde la variedad Chardonnay presenta un contenido de 650 mg/l, frente a los 151 mg/l de la Parellada, 138 mg/l de la variedad Macabeo y 191 mg/l de la variedad Xarello (Tablas 5.6 a 5.9).

Los aminoácidos libres de los vinos base para la elaboración de cavas juegan un papel importante durante la segunda fermentación como nutrientes de las levaduras. el aminoácido mayoritario en todas las muestras, es la prolina, seguido a gran distancia del ácido glutámico, la α -alanina y la arginina. En la Figura 5.1 se muestra, a modo de ejemplo, el cromatograma de los aminoácidos de una muestra de vino de la variedad Xarello. Se puede destacar el bajo contenido en aminoácidos de las muestras de la variedad Macabeo y el contenido elevado de la variedad Chardonnay. Los valores encontrados son del mismo orden que los obtenidos por Suarez y col. (1979) en un vino de cupada y algo inferiores que los obtenidos por Margheri y col. (1984).

Llama la atención en el conjunto de los datos recogidos en las Tablas 5.2 a 5.9 la gran homogeneidad de las muestras de cada una de las variedades. Tanto los valores medios como los valores máximos y mínimos son muy próximos a los obtenidos por Reglero (1985) en

Tabla 5.6

-181-

Tabla 5.7 Contenido (mg/l) en nitrógeno total y aminoácidos libres de los vinos base de la variedad Macabeo utilizados para la elaboración de cavas. a) Datos obtenidos; b) Reglero (1985).

	Nitrógeno total	PRO	ASP	GLU	HYPRO	ASN	GLN	SER	THR + GLY	-ALA	-ALA	GABA	VAL	MET	ARG	TRP + ILE	PHE
a) n = 7																	
X	138	122	2,89	2,88	0,98	2,36	1,02	1,32	4,09	4,65	1,01	5,67	1,34	0,83	3,09	4,40	5,31
S	27	44	2,18	2,08	1,02	1,36	0,84	0,75	1,22	3,37	0,39	2,17	1,06	0,36	2,22	4,57	3,60
Máx.	168	207	4,91	25,70	2,73	10,54	2,27	2,23	5,50	8,70	1,60	9,42	1,48	1,17	5,68	11,23	9,97
Mín.	105	89	0,60	0,60	0,20	0,66	0,16	0,20	2,90	0,34	0,64	3,71	3,27	0,20	0,20	0,47	0,62
b) n = 10																	
X	140	177	8,28	12,04	0,99	3,28	1,38	4,34	5,53	10,73	2,32	4,23	3,79	1,90	9,58	5,47	8,66
S	61	125	8,84	11,09	0,48	3,12	1,05	3,91	3,43	9,41	1,60	3,13	2,68	1,42	10,09	5,34	5,49
Máx.	249	498	30,92	39,61	1,76	8,86	3,24	13,14	12,45	34,11	3,68	11,02	9,04	5,13	33,99	14,48	16,26
Mín.	052	30	0,14	0,14	0,43	0,41	0,41	0,28	0,36	0,23	0,72	0,63	0,15	0,07	0,30	0,04	0,20

Tabla 5.8 Contenido (mg/l) en nitrógeno total y aminoácidos libres de los vinos base de la variedad Xarello utilizados para la elaboración de cavas. a) Datos obtenidos b) Reglero (1985).

		PRO	ASP	GLU	HYPRO	ASN	GLN	SER	THR + GLY	-ALA	-ALA	GABA	VAL	MET	ARG	TRP + ILE	PHE
a) n = 7																	
X	192	308	8,29	11,45	2,43	5,81	3,97	3,57	7,86	9,18	3,79	6,59	3,38	1,15	7,87	5,02	9,84
S	40	118	6,07	6,77	2,50	3,82	3,50	3,18	3,17	6,69	3,71	2,19	3,71	0,86	6,01	7,18	7,01
Máx.	253	500	14,86	13,78	5,27	11,23	9,32	9,33	12,99	16,47	10,80	9,46	10,84	2,30	15,35	17,20	18,20
Mín.	146	180	0,32	1,01	0,20	1,56	0,16	0,25	5,10	0,15	0,80	3,52	0,20	0,15	0,15	0,15	0,49
b) n = 10																	
X	202	412	9,29	19,20	3,18	4,68	3,73	6,24	8,59	21,32	4,56	17,54	4,41	2,01	59,87	8,41	9,08
S	124	138	11,53	30,80	1,42	5,17	5,27	8,02	7,54	32,39	4,88	44,41	3,56	1,77	144,44	8,77	8,40
Máx.	539	696	40,24	105,78	4,98	18,38	18,40	28,05	28,73	112,61	16,00	143,94	12,25	5,88	469,37	21,86	27,34
Mín.	100	258	0,66	1,47	0,85	0,90	0,89	0,64	1,77	3,70	0,80	1,39	0,13	0,18	1,00	0,28	0,78

Tabla 5.9. Contenido (mg/l) en nitrógeno total y aminoácidos libres de los vinos base de la variedad Chardonnay utilizados para la elaboración de cavas. a) Datos obtenidos b) Reglero (1985)

	Nitrógeno total	PRO	ASP	GLU	HYPRO	ASN	GLN	SER	THR + GLY	-ALA	-ALA	GABA	VAL	MET	ARG	TRP + ILE	PHE
a) n = 1																	
X	650	512	55.42	128.09	-	46.99	-	86.23	78.93	329.99	18.53	158.58	37.35	1.00	473.25	-	20.77
b) n = 2																	
X	746	1240	24.77	56.39	6.83	19.36	10.05	27.03	27.73	157.90	3.20	159.25	9.14	1.15	155.65	7.71	21.47
Máx.	966	1624	37.90	68.75	8.83	25.57	11.27	42.03	36.83	184.37	4.00	159.78	12.15	2.00	191.82	14.42	29.55
Mín.	525	855	11.60	44.04	4.83	13.78	8.75	12.04	18.64	131.43	2.80	159.68	6.12	0.35	119.52	1.00	13.39

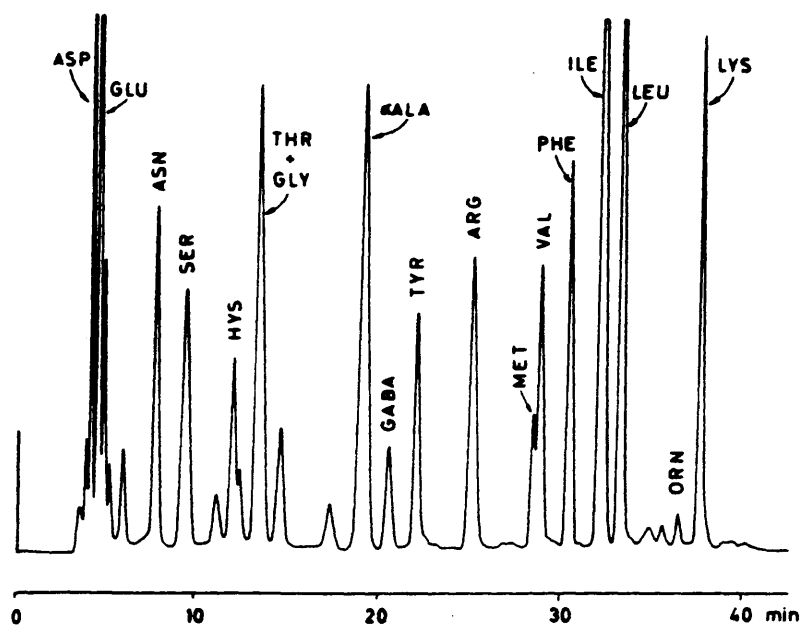


Figura 5.1. Cromatograma de los OPA-derivados de un vino de la variedad Xarello.
 Condiciones cromatográficas: Columna Radial Pak C-18, 10 μ m. Eluyente A: MeOH:fosfato sódico 0,01 M, pH 7,3:THF (19:80:1). Eluyente B: MeOH:fosfato sódico 0,01 M, pH 7,3 (80:20). Gradiente lineal: 0 min. (0%B, 1,5 ml/min.); 6 min. (15%B, 1,5 ml/min.); 11 min. (15%B, 1,5 ml/min.); 16 min. (30%B, 1,5 ml/min.); 20 min. (40%B, 1,5 ml/min.); 32 min. (80%B, 1,3 ml/min.); Detector de fluorescencia: λ_{exc} 340, λ_{em} 425.

muestras de las mismas variedades de otras vendimias. Estos vinos varietales, por otra parte, tienen características peculiares y es posible diferenciarlos por sus datos analíticos de los vinos de otras variedades como lo han demostrado Polo y col. (1983). También es posible distinguirlos entre sí. Usando análisis discriminante Cabezudo y col. (1986) diferencian entre sí vinos base para la elaboración de espumosos según la variedad de que proceden.

5.4.2 Estudio de la fracción proteica de mostos y de vinos base utilizados en la elaboración de cavas.

La concentración de proteína en los mostos de uva blanca de las variedades utilizadas para la elaboración de cavas (Tabla 5.10) está comprendida entre 3,7 y 9,7 mg BSA/l. La muestra de la variedad Monastrell, tinta, tiene un contenido más elevado (14,0 mg/l). Estos valores son del mismo orden que los encontrados por otros autores (Yokotsuka y col., 1977; Hsu y Heatherbell, 1987; Correa y col., 1988) en otras variedades.

La concentración de proteína de los vinos oscila entre valores muy próximos, desde 1,4 a 1,7 mg BSA/l, y son inferiores a los correspondientes a los mostos. Esta disminución del contenido en proteína durante la elaboración de los vinos se relaciona por un lado con la desnaturalización y posible precipitación de las proteínas durante la fermentación (Koch y Sajak, 1959; Bayly y Berg, 1967; Hsu y Heatherbell, 1987) y por otro con los tratamientos desproteinizantes (bentonita) a los que se les somete a los vinos. La reducción en el contenido en proteína de los vinos es un objetivo del elaborador para obtener una buena estabilización.

Tabla 5.10. Contenido en proteína y nitrógeno total de mostos y vinos base para la elaboración de cavas.

	Proteína (mg BSA/l)	N prot. (mg/l)	N total (mg/l)	N. prot. x100/N tot.
MOSTOS:				
Parellada 1	7.9	$1,26 \cdot 10^{-2}$	363	0,35
Parellada 2	5,3	$8,48 \cdot 10^{-3}$	93	0,91
Xarel-lo 1	9,7	$1,55 \cdot 10^{-2}$	349	0,44
Xarel-lo 2	9,6	$1,54 \cdot 10^{-2}$	363	0,42
Macabeo 1	8,9	$1,42 \cdot 10^{-2}$	493	0,29
Macabeo 2	3,7	$5,92 \cdot 10^{-4}$	233	0,25
VINOS:				
Parellada	1,5	$2,40 \cdot 10^{-4}$	143	0,17
Xarel-lo	1,7	$2,72 \cdot 10^{-4}$	148	0,18
Macabeo	1,4	$2,24 \cdot 10^{-4}$	140	0,16

Los resultados obtenidos al aplicar la electroforesis en gel de poliacrilamida sin agentes desnaturalizantes, se recogen en la Tabla 5.11.

En el caso de los mostos se han obtenido de 4 a 7 bandas con movilidades comprendidas entre 0,30 y 0,55, similares a las de otros mostos varietales de uvas españolas (Correa y col., 1988; Gonzalez-Lara y col., 1989). La observación directa de la placa permite observar diferencias entre los electroforegramas de los mostos de distintas especies y parecidos entre los correspondientes a la misma variedad. La electroforesis sobre gel de poliacrilamida sin agentes desnaturalizantes ha sido considerada como criterio de caracterización varietal por otros autores como vimos en el apartado 5.2.

En los vinos aparecen bandas de distinta movilidad que en los mostos correspondientes lo que indica la existencia de cambios en la fracción proteica durante su elaboración. El número de bandas en las muestras de vinos y el rango de sus movilidades es mayor que en las de mostos.

Al aplicar la electroforesis en gel de poliacrilamida con agentes desnaturalizantes (SDS), a las muestras de mostos (Tabla 5.12) se han separado bandas de pesos moleculares comprendidas entre 10000 y >80000 daltons. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Correa y col. (1988) y Gonzalez-Lara y col. (1989), para mostos de otras variedades de uva españolas.

Laminkara (1987) encuentra en uvas de la variedad Moscatel proteínas de peso molecular en torno a los 100000 daltons aunque él mismo señala que no es frecuente encontrar proteínas de peso molecular

Tabla 5.11. Movilidad electroforética de las bandas separadas por PAGE y teñidas con Azul Coomassie G-250 en las muestras de mostos y vinos varietales utilizados en la elaboración de cava.

		Movilidades:											
		0,20	0,25	0,30	0,35	0,39	0,42	0,46	0,50	0,52	0,55	0,58	
MOSTOS:													
Parellada 1	-	-	-	+	+++	-	+	+	-	-	-	-	-
Macabeo 1	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
Macabeo 2	-	-	-	+	++	+	+	+	-	-	-	-	-
Xarello 1	-	-	-	+++	++	+	++	+	+	-	-	-	-
Xarello 2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Monastrell 1	-	-	+	+++	+++	-	+	+	++	+	+	-	-
VINOS:													
Parellada	-	-	++	+++	-	+++	+++	-	+++	+	-	-	-
Macabeo	-	-	-	+	-	++	+	+++	+++	++	++	++	++
Xarello	+	+	-	++	++	++	+	+++	-	-	-	++	++
Chardonnay	+	-	++	+++	-	++	+++	+	+++	+	+	-	-

Tabla 5.12. Distribución porcentual de las bandas separadas por PAGE-SDS y teñidas con Azul Coomassie R-250 de mostos y vinos varietales utilizados para la elaboración de cavas.

	Pesos moleculares (daltons x 10 ⁻³):							
	>80	69-60	59-50	49-40	39-30	29-20	19-10	
MUSTOS:								
Parellada	-	5.4	5.5	-	28.2	51.8	9.1	
Macabeo 2	5.2	8.9	4.0	2.3	-	77.5	1.6	
Xarel·lo 2	4.3	6.5	-	-	17.3	62.9	9.0	
Monastrell	8.4	4.2	-	-	29.2	55.5	2.4	
VINOS:								
Parellada	5.2	9.4	-	2.6	31.8	45.8	4.8	
Macabeo	5.6	8.5	-	-	40.1	45.6	-	
Xarel·lo	-	8.3	-	-	32.6	59.1	-	
Chardonay	7.4	8.3	-	-	25.6	58.6	-	

superior a 30000 daltons, resultados similares son obtenidos por Hsu y Heatherbell (1987).

La distribución de pesos moleculares de las proteínas de los vinos es muy semejante a la de los mostos, es decir, están comprendidos entre 10000 y >80000 daltons. Hsu y Heatherbell (1987) obtienen resultados similares. Dubordieu y col. (1986) por cromatografía de líquidos de alta eficacia de exclusión molecular encuentran que las proteínas mayoritarias de un vino blanco seco tienen pesos moleculares entre 25000 y 29000 daltons.

Los puntos isoelectricos de las proteínas de los mostos y vinos estudiados (Tabla 5.13) están comprendidos entre 3,8 y 7,5. Las bandas mayoritarias tienen puntos isoelectricos comprendidos entre 4 y 6. Estos resultados coinciden con los encontrados por la mayoría de los autores que han estudiado esta técnica (Moreti y Berg, 1965; Bailly y Berg, 1967; Radola y Richter, 1972; Drawert y Muller, 1973; Ough y Anelli, 1979; Gorg y col., 1982; Hsu y Heatherbell, 1987; Correa y col., 1988). Otros autores como Anelli (1977), encuentran proteínas aún más ácidas, con pI de 2,5, aunque son minoritarias, en mostos de la variedad Malvasia Istriana. Laminkara (1987), encuentra que en la variedad Moscatel, todas las proteínas tienen pI comprendidos entre 5,6 y 7,6.

Los resultados obtenidos por isoelectroenfoque no permiten establecer diferencias varietales ni en los mostos ni en los vinos.

5.5 CONCLUSIONES.

El grado alcohólico de los vinos destinados a la elaboración de espumosos resulta ser de 11,0° para un total de 53 vinos.

Tabla 5.13. Distribución porcentual de las bandas separadas por isoelectroenfoque y teñidas con Azul Coomassie G-250, de mostos y vinos varietales utilizados para la elaboración de cavas.

Puntos Isoeléctricos:											
		7.5-7.1	6.6-6.4	5.7-5.5	5.4-5.2	5.1-4.9	4.8-4.6	4.5-4.3	4.2-4.0	3.9-3.7	
MOSTOS:											
Parellada 1	6.9	-	-	3.2	-	9.3	46.2	-	34.0	-	
Parellada 2	-	-	-	-	12.2	-	29.5	32.0	33.2	-	
Macabeu 1	-	-	-	4.6	2.5	-	37.7	55.1	-	-	
Macabeu 2	-	-	-	27.0	5.2	7.2	28.4	32.2	-	-	
Xarello 1	3.3	-	-	-	9.0	8.2	19.7	57.9	1.9	-	
Xarello 2	-	-	-	-	-	4.1	46.7	49.2	-	-	
Monastrell	2.2	-	-	-	5.5	-	24.0	68.4	-	-	
VINOS:											
Parellada	4.1	-	-	-	12.9	67.7	1.8	11.0	-	-	
Xarello	3.8	2.6	-	-	8.5	4.8	64.9	6.1	7.5	-	
Macabeu	-	-	-	-	-	92.7	-	7.3	-	-	
Chardonnay	-	-	-	-	15.0	6.4	76.6	-	-	2.0	

La concentración de proteína es menor de 10 mg BSA/l, en los mostos y menor de 2 mg BSA/l en los vinos. El nitrógeno proteico representa menos del 1 % del nitrógeno total en los mostos y menos del 0,2 % en los vinos.

La movilidad electroforética de las proteínas es menor en los vinos que en los mostos. En ambos casos predominan las fracciones de peso molecular menor de 40000 daltons. Los puntos isoelectricos están comprendidos entre 3,7 y 7,5 siendo mayoritarias las de puntos isoelectricos comprendidos entre 4,0 y 5,4.

CAPITULO 6

COMPOSICION DE TARTRATOS PROCEDENTES DE DEPOSITOS DE FERMENTACION,
ALMACENAMIENTO Y ESTABILIZACION DE VINOS BASE PARA LA ELABORACION DE
CAVAS.

RESUMEN

La precipitación del KHT conduce a la formación de los sedimentos responsables de la turbidez en el vino embotellado. Dada la afinidad existente entre el KHT y las sustancias responsables de la ralentización e inhibición de la precipitación, estas deben formar parte de los sedimentos tartáricos. Para discutir el problema de la precipitación se ha analizado la composición de los depósitos tartáricos, procedentes de distintas fases de la elaboración de los vinos, empleando técnicas físicas, difracción y fluorescencia de Rayos X, y análisis químicos y enzimáticos. Analizando las fases cristalinas presentes, cationes y sustancias orgánicas (ácidos, polisacáridos, proteínas y polifenoles) en los sedimentos. Estos resultados permiten encontrar la fórmula estequiométrica del precipitado lo que aporta información acerca de la naturaleza de los inhibidores de la precipitación.

6.1. INTRODUCCION.

Aunque la sal que precipita mayoritariamente es KHT, es posible la precipitación de otras sales como el tartrato, el oxalato o el malato cálcico. La existencia de estas sales en un precipitado, se puede detectar por sus diferentes características morfológicas (Hagen, 1979), sin embargo al formarse los cristales en el vino, la

inevitable interacción con los compuestos que lo constituyen pueda variar su morfología pudiendo ser necesario recurrir a reactivos específicos para decidir acerca de su naturaleza (Quinsland, 1978). En el caso de que un mismo anión pueda conducir a sales distintas, como ocurre con el bitartrato potásico y el tartrato cálcico, es preciso recurrir a otras técnicas.

La utilización de métodos físicos pueda ayudar en el conocimiento de la naturaleza de los cristales presentes en el vino. Así, Silva y col. (1984) utilizan la microscopía electrónica para estudiar las diferencias morfológicas existentes entre las sales tartáricas y otras del vino (ácido y oxalato cálcico). Estos autores también estudian la distinta morfología de los cristales en vinos enriquecidos artificialmente en coloides.

Lockwood y col. (1984), han utilizado la espectroscopía Raman e Infrarroja para estudiar los sedimentos presentes en vinos embotellados. Estos autores, no encuentran evidencias espectrales de la presencia de otros compuestos distintos de las sales tartáricas en estos sedimentos, ni encuentran correlación entre los parámetros analíticos del vino y la presencia de sedimentos. Advierten que el tartrato cálcico cristaliza preferentemente en el corcho de las botellas, en forma de cristales pequeños y regulares, lo que relacionan con una cristalización lenta. El bitartrato potásico no tiene lugar preferente de cristalización tan claro y los cristales son más irregulares, debido a una cristalización más rápida por cambios en la temperatura de almacenamiento. La utilización de la espectroscopía Raman ha proporcionado una evidencia experimental de la presencia

conjunta de ambas sales, limitándose estos autores al análisis cualitativo de los sedimentos encontrados en las botella.

La técnica de difracción de Rayos X es un método universal en la detección de sólidos cristalinos. El diagrama de difracción de Rayos X de una mezcla de sustancias cristalinas resulta ser una mezcla de los diagramas de las sustancias puras que la constituyen. La posible coincidencia de picos de difracción, lleva consigo una pérdida de información en la determinación de las fases presentes en la mezcla. La medida de la intensidad de pico de los diagramas de las muestras problemas es un paso crítico en la utilización de la difracción de Rayos X con fines cuantitativos (Rodríguez, 1982).

En el capítulo 4 se ha descrito la morfología de los cristales de KHT y se ha visto como los inhibidores de la precipitación se adsorben sobre estos cristales. Dada la naturaleza de la unión entre los cristales y los inhibidores, se producirá una precipitación conjunta de ambos. La pureza de los tartratos obtenidos en un proceso de precipitación podemos esperar que sea muy alta, pero van acompañados de pequeñas cantidades de otros compuestos que se suponen responsables de la lentitud con que en el vino, se produce la precipitación del KHT en comparación con una solución del mismo grado alcohólico. Dado que el vino es un medio biológico muy complejo, donde coexisten compuestos sintetizados a través de las rutas metabólicas presentes en la uva, compuestos producidos en la fermentación alcohólica y compuestos excretados por las levaduras, las posibilidades de interacción con los cristales de KHT son muchas.

Hasta ahora no se ha realizado ningún estudio de los depósitos tartáricos con vistas a conocer las causas reales de la inhibición de

la precipitación. La composición de estos precipitados puede indicar si existen sustancias que precipitan preferentemente con el KHT.

No tenemos ninguna referencia bibliográfica de la cuantificación de estas sales en los sedimentos cristalinos formados en depósitos de elaboración y estabilización por frío de los vinos, por lo que hemos abordado su análisis. En primer lugar hemos estudiado la naturaleza de los precipitados desde el punto de vista físico, aplicando la difracción de Rayos X para conocer las fases cristalinas presentes. En segundo lugar, se ha determinado la composición estequiométrica del precipitado y analizado los elementos y familias de compuestos que, a modo de impurezas, precipitan conjuntamente con aquellas.

6.2 MATERIALES Y METODOS.

6.2.1 Muestras.

Se han utilizado tartratos procedentes de fermentación, almacenamiento y estabilización por frío de vinos base destinados a la elaboración de cava, cuya procedencia se detalla en la Tabla 6.1.

6.2.2 Difracción de Rayos X.

6.2.2.1 Equipo instrumental.

Se ha utilizado un difractómetro Phillips modelo PW 1771/00 con tubo de cobre y una unidad de control modelo PW 1710/00. En estas condiciones, la relación entre el espaciado, d , y el ángulo de incidencia, θ , es:

$$d = 2 \sin \theta / 1,5410$$

6.2.2.2 Curva de calibrado.

Se ha utilizado como patrón mezclas de KHT (Merck ref.: 4892) con un contenido del 5, 10 y 15 % de $\text{CaI} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (Fluka Ref.: 21249).

Tabla 6.1. Procedencia de los tartratos estudiados.

Muestra:

- | | |
|---|--|
| 1 | Tartratos de depósitos de acero inoxidable (Aisi 316) donde se han almacenado vinos. |
| 2 | Tartratos de depósitos de hormigón armado recubierto de baldosín cerámico que han tenido vinos del primer trasiego. |
| 3 | Tartratos de procedencia heterogénea, escogidos por su forma extraña de las eras de secado de los mismos. |
| 4 | Tartratos de barricas de roble que han contenido vinos de varias vendimias. |
| 5 | Tartratos de depósitos de acero inoxidable que se han utilizado para fermentar y almacenar vinos. |
| 6 | Tartratos procedentes de tratamiento por frío con estabulación estática durante 10-12 días, a -4°C en depósitos de acero inoxidable. |
| 7 | Idem que la muestra 6 pero en depósitos de hormigón revestido con resinas epoxi. |
-

6.2.3 Preparación de la muestra.

6.2.3.1 Fluorescencia de Rayos X.

Para el análisis por fluorescencia de Rayos X, a 5 gramos de la muestra pulverizada en mortero de ágata se le añaden 2 ml. de solución de Elvacite 2044(N-butil metacrilato), en acetona 1:5. Se homogeniza y se prensa a 20 Tm durante 1 minuto.

6.2.3.2 Análisis químicos.

Para los análisis químicos que necesiten partir de la muestra disuelta: 5 gramos de muestra, se pulverizan en mortero de ágata hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Se toman 0.5 gramos de este polvo y se disuelven en 100 ml. de HCl 0.1 N.

6.2.3.3 Análisis de Proteínas.

Para el análisis de las proteínas se ha partido de 300 ml de muestra disuelta en HCl 0,1 N, como se describe en el apartado 6.2.3.2, se dializan durante 48 horas frente a agua corriente en membranas de 3500 daltons de tamaño de corte y se concentran por secado en una solución de Carbowax 20 M, hasta un volumen final de 5 ml.

6.2.3.4 Análisis de compuestos fenólicos.

Se ha seguido el protocolo descrito por Diez y col. 1980. partiendo de la muestra disuelta en HCl 0,1 N como se describe en el apartado 6.2.3.2. Se concentra en el rotavapor a 40 °C, se extrae con éter etílico, se deseca con sulfato sódico, se lleva a sequedad en el rotavapor y se recoge el residuo en metanol:agua (1:1).

6.2.4 Determinación de sodio, hierro, magnesio, calcio y potasio, por Fluorescencia de Rayos X.

6.2.4.1 Equipo instrumental.

Se ha utilizado un espectrofotómetro de Fluorescencia de Rayos X, modelo PW 1410/20 semiautomático.

6.2.4.2 Determinación de las pérdidas por calcinación.

Se determinan sobre 1 gramo de muestra a 1000°C. Se expresan en tanto por ciento y corresponde a la materia orgánica y posible agua de hidratación presente en la muestra.

6.2.4.3 Condiciones experimentales.

En la Tabla 6.2, se presentan la potencia de generador, cristal y línea de pico (2 θ) característica para cada elemento. En todos los casos se ha utilizado tubo de cromo y detector proporcional de flujo.

6.2.4.4 Curva de calibrado.

Se realizó con un patrón de bitartrato potásico de calidad para análisis (Merck Ref. 4892). Para la transformación de intensidades en concentraciones se ha empleado un método de corrección completa de los efectos matriciales mediante la aplicación de coeficientes de corrección experimentales desarrollado por Franzini y col. (1975).

6.2.5 Determinación de cobre por espectrofotometría de Absorción Atómica.

6.2.5.1 Equipo instrumental.

Se ha utilizado un espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer, modelo 2308.

Tabla 6.2. Condiciones experimentales utilizadas en el análisis por Fluorescencia de Rayos X de los distintos elementos.

Elemento	Potencia del generador (kV, mA)	Cristal	Línea de pico 2 θ
Silicio	(30, 20)	Germanio	109,12
Aluminio	(30, 20)	Talio	37,75
Hierro	(20, 10)	LiF ₂₀₀	57,51
Magnesio	(40, 60)	Talio	45,51
Calcio	(20, 10)	LiF ₂₀₀	113,12
Sodio	(40, 60)	Talio	55,09
Potasio	(20, 10)	LiF ₂₀₀	136,71
Fósforo	(50, 20)	Germanio	140,98

6.2.5.2 Curva de calibrado.

Solución madre de 1000 mg/l de cobre de la firma Merck, referencia 9987.

Soluciones de trabajo: Se han preparado en concentraciones comprendidas entre 0,4 y 1,0 mg/l, por dilución de la solución madre. Las diluciones se han realizado con solución saturada en KHT (aproximadamente 5 gr/l) para eliminar la posible interferencia del ión potasio.

6.2.6 Determinación de carbono e hidrógeno.

Se ha utilizado un equipo Heraeus CHN-O-RAPID para análisis elemental.

6.2.7 Nitrógeno total.

Se ha realizado por el método Kjeldahl, según se detalla en el apartado 5.3.16.

6.2.8 Acido tartárico.

Se ha realizado por el método de Vidal y Blouin (1978) basado en la reacción con metavanadato a pH 4,6 y medida de la densidad óptica a 500 nm., como se ha descrito en el apartado 5.3.8.

6.2.9 Acido málico.

Determinación enzimática (Bohringer Mannheim, 1975), según se ha descrito en el apartado 5.3.9.

6.2.10 Acido oxálico.

Determinación enzimática según Bohringer Mannheim (1986), basada en la descarboxilación del ácido oxálico por la oxalato descarboxilasa a CO₂ y ácido fórmico y oxidación de éste a ión bicarbonato por la FDN en presencia de NAD. La cantidad de NADH formada es estequiométrica con la cantidad de ácido oxálico presente en la muestra.

6.2.11 Azúcares reductores libres.

Medida del poder reductor sobre una solución cuproalcalina.

6.2.12 Azúcares reductores totales.

Hidrólisis ácida y determinación posterior de azúcares reductores.

6.2.13 Proteínas.

Se ha seguido el método Bradford (Bradford, 1976) descrito en el apartado 5.3.20.

6.2.14 Polifenoles totales.

Reacción colorimétrica de los polifenoles con los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico y medida de la absorbancia a 670 nm. (Singleton y Rossi, 1965).

6.2.15 Polifenoles poco polimerizados.

Precipitación de las formas más polimerizadas con solución saturada de cloruro sódico, centrifugación y determinación de polifenoles en el sobrenadante (Masquelier y col. 1965).

6.2.16 Leucoantocianos.

Reacción con n-butanol:HCl (1:1) en caliente y medida de la densidad óptica a 550 nm. (Peri y Pompei, 1971).

6.2.17 Catequinas.

Reacción con vainillina en medio clorhídrico y medida de la absorbancia a 500 nm. (Swain y Hillis, 1959).

6.2.18 Ácidos fenólicos y sus ésteres por cromatografía de líquidos de alta eficacia.

6.2.18.1 Equipo instrumental.

Se ha utilizado un cromatógrafo de líquidos de la firma Waters, formado por dos bombas modelo 6000 A, un programador de solvente 720,

un inyector U6K, una columna Novapak, de 25 cm. y 4 μ de tamaño de partícula y un detector de UV modelo 440 con filtros de 280 y 340 nm.

6.2.18.2 Condiciones cromatográficas.

Los eluyentes empleados han sido: Eluyente A: ácido acético:agua (2:98). Eluyente B: ácido acético:metanol:agua (2:30:68).

Gradiente, curva 5: 0 min. (0 % B, 0,6 ml/min); 10 min (40 % B, 0,6 ml/min); 15 min (50 % B, 0,6 ml/min); 20 min (60 % B, 0,5 ml/min); 30 min (70 % B, 0,4 ml/min); 40 min (75 % B, 0,4 ml/min); 45 min (86 % B, 0,3 ml/min); 50 min (85 % B, 0,7 ml/min); 60 min (85 % B, 0,8 ml/min).

6.3 RESULTADOS Y DISCUSION.

Los difractogramas correspondientes a las sales puras de KHT y $\text{CaT.4H}_2\text{O}$ (Figuras 4.9 y 6.1) obtenidos en el laboratorio coinciden plenamente con las fichas ASTM (American Society for Testing Materials) de ambas sales tartáricas (Tablas 4.11 y 6.3.).

Los diagramas de difracción de Rayos X de los patrones y de las distintas muestras se recogen en las Figuras 6.1 a 6.5. Se puede apreciar en todas las muestras, que los picos más intensos son los correspondientes al KHT, los que aparecen en un ángulo 2θ de $27,6^\circ$.

La existencia de tartrato cálcico tetrahidratado en el precipitado, debe ponerse de manifiesto por alguno de sus picos mayoritarios (los correspondientes a los espaciados 6.66 ó 7,12 Å) como muestra su ficha ASTM (Tabla 6.3). La importancia de los picos correspondientes a estos espaciados se puede apreciar en los difractogramas correspondientes a las muestras 1 a 5, correspondientes a tartratos que proceden de depósitos de elaboración y almacenamiento

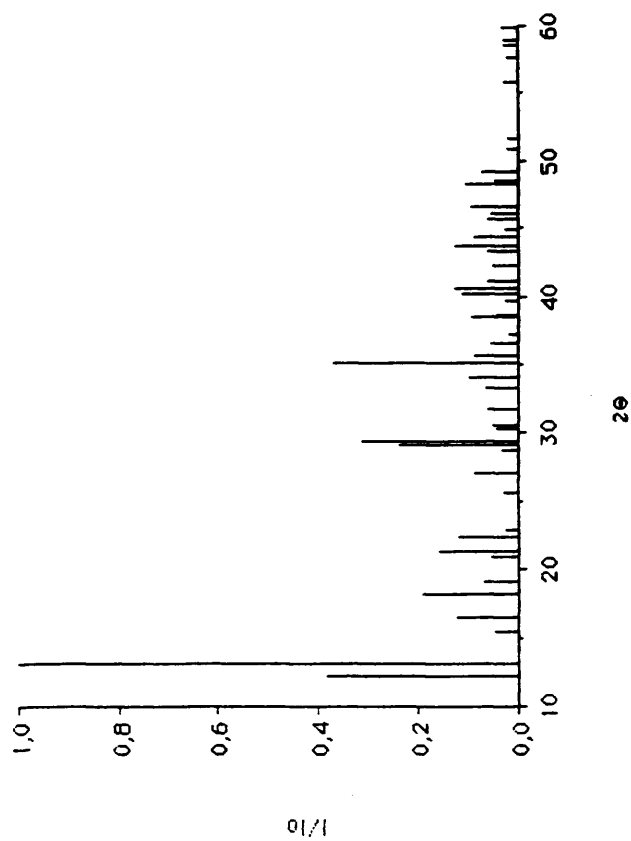


Figura 6.1. Difractograma de Rayos X correspondiente al tartrato cálcico tetrahidratado puro.

Joint Committee on Powder Diffraction Standards 1976

Joint Committee on Powder Diffraction Standards 1976

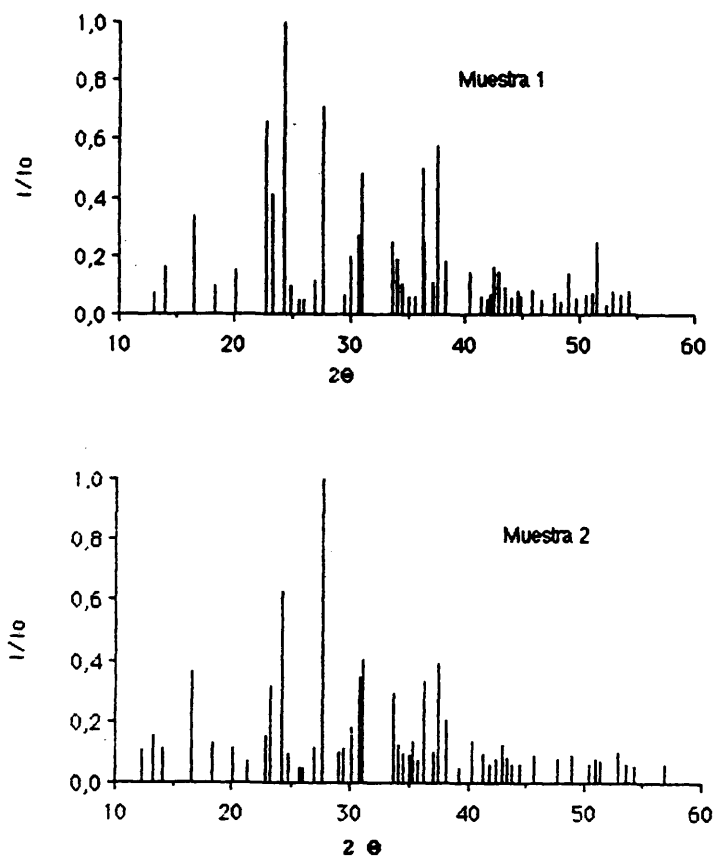


Figura 6.2. Difractograma de Rayos X de las muestras estudiadas: a) Tartratos recogidos en depósitos de acero inoxidable (AISI 316) donde se han almacenado vinos (muestra nº 1). b) Tartratos recogidos en depósitos de hormigón armado recubierto de baldosín cerámico que han contenido vinos del primer trasiego (muestra nº 2).

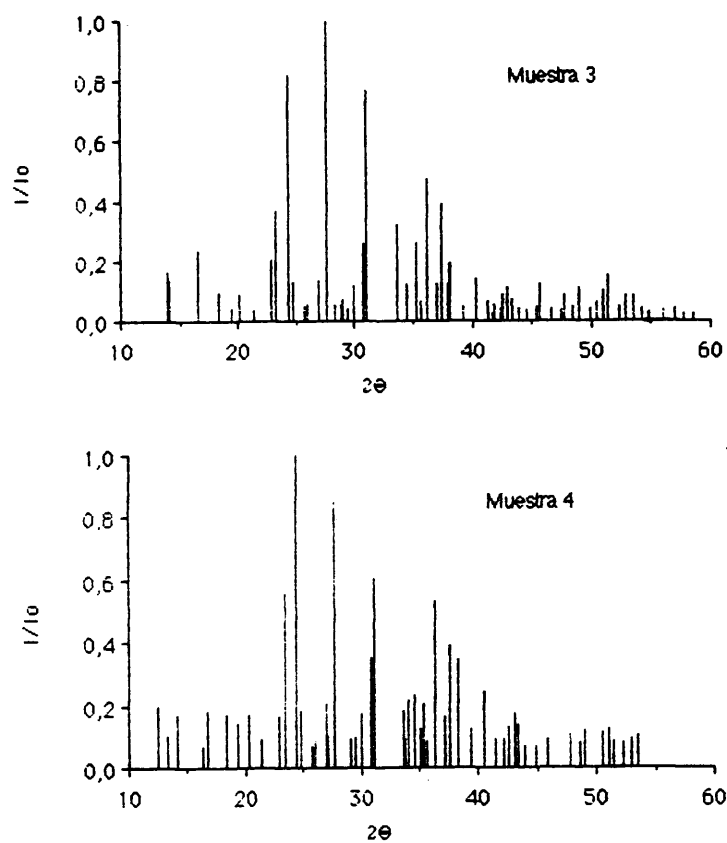


Figura 6.3. Difractograma de Rayos X de las muestras estudiadas: a) Tartratos de procedencia diversa, escogidos por su forma extraña de las eras de secado de los mismos (muestra nº 3). b) Tartratos recogidos en barricas de roble que han contenido vinos de varias vendimias (muestra nº 4).

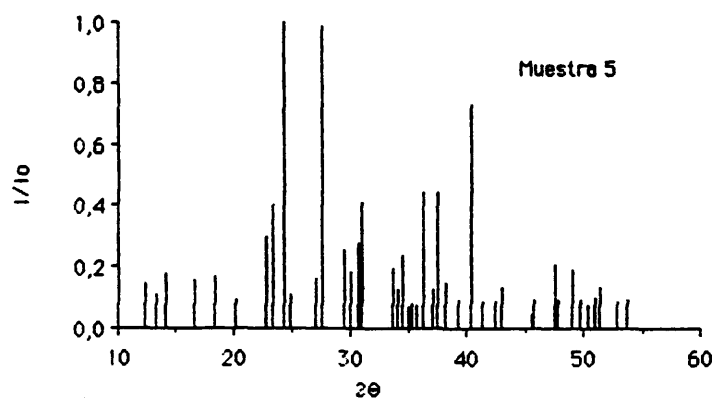


Figura 6.4. Difractograma de Rayos X de tartratos recogidos en depósitos de acero inoxidable que se han utilizado para fermentar mostos (muestra nº 5).

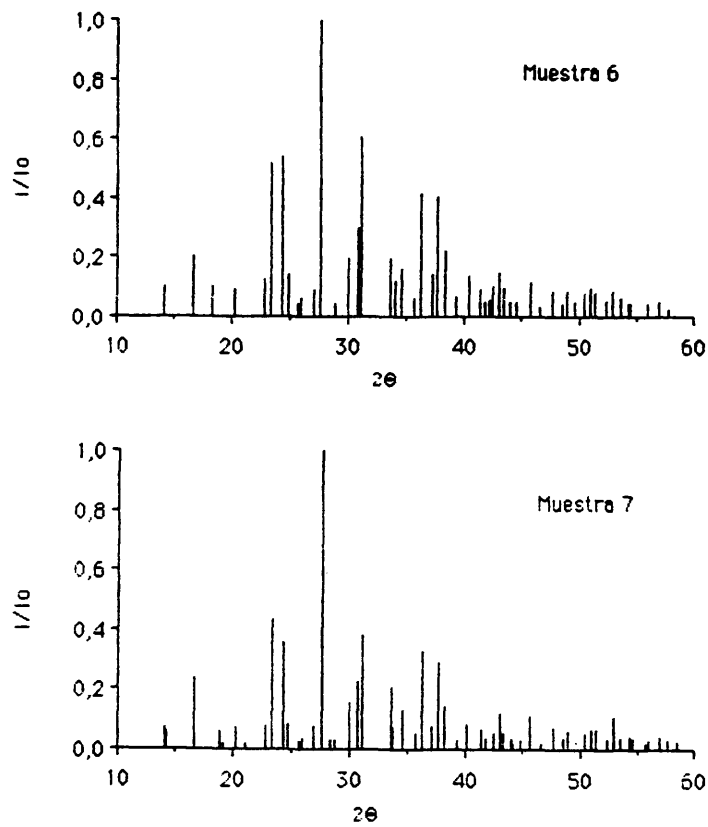


Figura 6.5. Difractograma de Rayos X de las muestras estudiadas: a) Tartratos recogidos en depósitos de acero inoxidable donde se ha realizado el tratamiento por frío por estabilización tradicional (enfriado a -4°C , durante 10-12 días) (muestra nº 6). b) Tartratos recogidos en depósitos de hormigón revestido con resinas epoxi donde se ha realizado el tratamiento por frío como se ha indicado en a) (muestra nº 7).

de vinos. En cambio, los tartratos que proceden del tratamiento por frío, no presentan picos correspondientes al tartrato cálcico (13,3°).

Para cuantificar la proporción de tartrato cálcico se ha utilizado el método de las relaciones de áreas, habitual en esta técnica. En los ensayos previos se comprobó que en el caso del tartrato cálcico el pico más intenso, aparecía a un espaciado de 6.69 Å correspondiente a un ángulo 2θ de 13.223° y en el caso del bitartrato potásico a un espaciado de 3.22 Å correspondiente a un ángulo 2θ de 27.595°, que se ha escogido para la cuantificación. La ecuación de regresión de las relaciones de áreas de estos picos con respecto a la proporción en que se encuentran ambas sales, se expresa en la Tabla 6.4.. En la Tabla 6.5 se muestra la relación CaT/KHT para las muestras analizadas, así como el porcentaje de Ca. En esta Tabla se observa que la precipitación de tartrato cálcico durante la fermentación y almacenamiento de vinos ocurre en mucha menor proporción que la de bitartrato potásico y no se detecta CaT en las muestras 6 y 7 procedentes de depósitos de estabilización por frío.

El resultado de los análisis de los elementos químicos presentes en las muestras de tartratos, se muestra en la Tabla 6.6. En ella se puede apreciar que el catión mayoritario, con gran diferencia es, en todas las muestras, el potasio seguido del calcio. Las muestras que presentan menor contenido en calcio son la 6 y la 7, ambas procedentes de depósitos de la estabilización por frío, como vimos en el estudio por Difracción por Rayos X, lo que pone de manifiesto la poca variación en la solubilidad del tartrato cálcico con la temperatura. Estos resultados cuantitativos obtenidos para el calcio son superiores en todos los casos a los obtenidos por difracción de Rayos X. Mediante

Tabla 6.4. Valores experimentales obtenidos por difracción de Rayos X de y (relación de las áreas de los picos correspondientes a CaI $4H_2O$ y KHT) y x (g CaI $4H_2O$ /g KHT), y ecuación de regresión de y sobre x.

x	y	Regresión de y sobre x
0,0526	0,0332	
0,1111	0,0515	$y = 0,0013 + 0,5093 x$
0,1765	0,0938	$r = 0,996$
0,2500	0,1285	

Tabla 6.5. Relación CaI $4H_2O$ /KHT y porcentaje de Ca en las muestras problemas.

Muestra	CaI $4H_2O$ /EET	% Ca
1	0,0452	0,69
2	0,1352	2,09
3	0,0523	0,80
4	0,1024	1,58
5	0,0895	1,38
6	0	0
7	0	0

Tabla 6.6. Elementos presentes en los tartratos analizados.

Muestra	C	H	K	Ca	N	Si	Al	Fe	Ni	Na	P	Cu
KHTartr	25,53	2,71	20,87	0,04	-	0,03	0,01	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	<0,01
1	24,14	3,14	18,51	2,86	0,10	0,01	0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,01	0,01
2	24,42	3,10	18,10	3,21	0,12	0,01	0,01	0,01	<0,01	0,04	0,01	0,01
3	22,39	3,22	19,64	1,17	0,16	0,02	0,01	<0,01	<0,01	0,03	0,01	0,01
4	23,74	3,37	18,20	2,52	0,18	0,10	0,02	0,01	<0,01	0,02	0,02	<0,01
5	21,90	3,24	19,13	2,04	0,24	0,03	0,01	0,01	<0,01	0,07	0,02	0,01
6	26,62	2,90	20,75	0,10	0,28	0,03	0,01	0,01	<0,01	0,04	0,01	<0,01
7	26,44	3,02	20,29	0,09	0,25	0,03	0,01	<0,01	<0,01	0,02	0,01	<0,01

fluorescencia de Rayos X, se determina todo el calcio presente en la muestra independientemente de la fase cristalina en la que se encuentre, en cambio en la difracción de Rayos X la respuesta de estas se ve afectada por las diferencias entre el tamaño de grano de las muestras y de los patrones utilizados y por el grado de cristalinidad de las mismas. El CaT es una sal insoluble que tiene tendencia a la formación de precipitados amorfos, como hemos podido comprobar en el laboratorio al intentar su síntesis. Ya que no se ha podido detectar ninguna otra fase cristalina en los difractogramas y al ser el contenido en calcio determinado por fluorescencia superior, en todos los casos, al determinado por difracción de Rayos X, suponemos que existen precipitados amorfos de CaT.

El resto de los elementos analizados están en muy pequeñas cantidades, no pudiéndose establecer una precipitación preferente de ninguno de ellos con las sales tartáricas, por lo que suponemos que la participación de los mismos en el equilibrio de precipitación, si ocurre, se limita al acomplejamiento en solución de los iones precipitantes.

Con los resultados del análisis del potasio y el calcio y los correspondientes al análisis elemental, podemos obtener la fórmula estequiométrica. No hemos considerado el resto de los elementos, ya que representan menos del 0,6 % del total de la muestra.

Al tratarse de una muestra sólida, que debe ser disuelta para su análisis, no existe posibilidad de analizar los aniones bitartrato y tartrato por separado, dada la dependencia de su concentración con el pH. Por esta razón, se ha tomado para el cálculo de la fórmula

estequiométrica, el contenido en carbono e hidrógeno obtenido mediante el análisis elemental de las muestras.

La Tabla 6.7, construida a partir de la composición centesimal en los elementos mayoritarios mostrada en la Tabla 6.6, muestra el número de equivalentes gramo presentes en 100 g de cada una de las muestras. A partir de ella, se ha construido la Tabla 6.8 que representa la proporción estequiométrica de los elementos en las muestras. A partir de las fórmulas moleculares de las dos sales tartáricas: $C_4H_4O_6K$ y $C_4H_4O_6Ca \cdot 4H_2O$, se ha calculado el carbono e hidrógeno teórico necesario para precipitar estequiométricamente los cationes presentes.

La precipitación de una sal debe ser estequiométrica, es decir, debe cumplir el balance de cargas. En el caso del bitartrato potásico, el catión potasio aporta las cargas positivas necesarias para neutralizar las cargas negativas aportadas por el anión bitartrato.

El defecto de carbono que forma parte del anión bitartrato en las muestras 1 a 5, indica que han precipitado, junto con los cationes potasio y calcio otras sustancias cargadas negativamente, de naturaleza aniónica que llegan a aportar por término medio un 10 % de la carga correspondiente al carbono total precipitado.

En las muestras 6 y 7, procedentes de depósitos de estabilización por frío, se observa la tendencia contraria. Existe un exceso de carbono en el precipitado, o lo que es lo mismo, un defecto de potasio. Esto indica que otros componentes con carga positiva han precipitado junto con los aniones tartrato y bitartrato. Con esto queda demostrada una vez más la interferencia de otras sustancias en la precipitación del KHT y CaI del vino y que esta interferencia es diferente cuando se produce la precipitación espontánea a temperatura

Tabla 6.7. Número de equivalentes-gramo de los elementos mayoritarios en 100 gramos de muestra.

Muestra	C	H	K	Ca
1	2,01	3,14	0,47	0,07
2	2,04	3,10	0,45	0,08
3	1,87	3,22	0,50	0,03
4	1,98	3,37	0,47	0,06
5	1,83	3,24	0,49	0,05
6	2,22	2,90	0,53	0,0025
7	2,20	3,02	0,52	0,0023

Tabla 0.8. Relación estequiométrica de los elementos mayoritarios en las muestras.

Muestra	C	H	K	Ca	C*	H*	C - C*	H - H*	(C-C*)%	(H-H*)%
1	28,71	44,86	6,71	1	30,84	45,55	-2,13	-0,69	-7,42	-0,69
2	25,50	38,75	5,75	1	27,00	40,75	-1,50	-2,00	-5,88	-5,16
3	62,33	107,33	16,67	1	70,68	95,35	-8,35	+11,98	-13,40	+11,16
4	33,00	56,17	7,83	1	35,32	51,15	-2,32	+5,02	-7,03	+8,94
5	36,60	64,80	9,80	1	43,20	61,00	-6,60	+3,80	-18,03	+5,86
6	888,00	1160,00	212,00	1	852,00	1072,00	+36,00	+88,00	+4,05	+7,59
7	977,78	1342,22	231,11	1	928,44	1167,00	+49,34	+175,22	+5,05	+13,05

ambiente, nucleación heterogénea, de cuando tiene lugar con ayuda del frío, nucleación homogénea.

Los aniones malato y oxalato (Tabla 6.9) se han detectado en cantidades menores de 0,01% en todos los casos. No se ha detectado la presencia de azúcares reductores libres y sí la existencia de cantidades muy pequeñas, no cuantificables de formas más polimerizadas.

Los compuestos orgánicos mayoritarios, distintos del bitartrato, detectados en las muestras son los polifenoles y las proteínas (Tabla 6.9). Las muestras 6 y 7, procedentes de depósitos de estabilización por frío son las que contienen estos compuestos en mayor cantidad.

La Tabla 6.10, muestra los datos de las fracciones polifenólicas determinadas. Se han encontrado diferencias en la cantidad de polifenoles totales y en el grado de polimerización de los mismos. Las dos muestras procedentes de depósitos de estabilización por frío son distintas del resto, ya que solo el 20% (muestra 6) y el 16% (muestra 7) de los polifenoles están poco polimerizados mientras que en el resto de los tartratos estas formas polifenólicas poco polimerizadas constituyen del 75 al 97% de los polifenoles totales.

No dan positiva la reacción de las catequinas, excepto la muestra 1 y sí la de leucoantocianos.

Por cromatografía de líquidos de alta eficacia, se ha realizado el estudio cualitativo y semicuantitativo de los compuestos fenólicos. La Figura 6.6 muestra los cromatogramas a 250 y 340 nm de una de las muestras estudiadas. Los compuestos detectados y las relaciones existentes entre ellos, se encuentran en la Tabla 6.11. En la misma Tabla se recogen los valores medios encontrados para estas relaciones

Tabla 6.9. Compuestos orgánicos presentes en los tartratos (%).

Muestra	Acido Tartárico	Poliifenoles totales (ac. gálico)	Proteína (BSA)	Acido Málico	Acido Oxálico
1	75,07	0,120	0,012	<0,01	<0,01
2	70,56	0,210	0,051	<0,01	<0,01
3	75,93	0,110	0,035	<0,01	<0,01
4	78,82	0,130	0,053	<0,01	<0,01
5	72,35	0,130	0,011	<0,01	<0,01
6	73,62	0,360	0,064	<0,01	<0,01
7	74,00	0,350	0,058	<0,01	<0,01

Tabla 6.10. Distribución porcentual de la fracción polifenólica en los tartratos analizados.

Muestra	Polifenoles			
	Polifenoles totales (Ac. gálico)	Poco polimerizados (Ac. gálico)	Catequinas	Leucoantocianos (Cl. de cianidina)
1	0,120	0,102	0,005	0,051
2	0,210	0,157	0	0,038
3	0,110	0,085	0	0,003
4	0,130	0,115	0	0,003
5	0,130	0,126	0	0,003
6	0,360	0,073	0	0,003
7	0,350	0,056	0	0,003

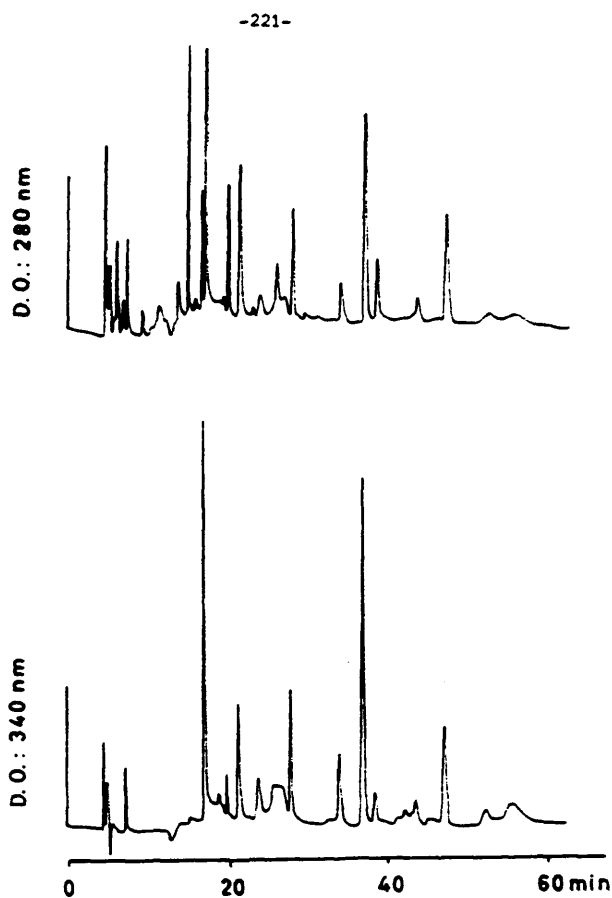


Figura 6.6. Cromatograma de la fracción fenólica de bajo peso molecular correspondiente a la muestra n^o3 cuya procedencia se detalla en la Tabla 6.1. Condiciones cromatográficas: Columna Novapak de 25 cm. y 4 μ m de tamaño de partícula. Eluyente A: AcH:H₂O (2:98). Eluyente B: AcH:MeOH:H₂O (2:30:68). Gradiente, curva 5: 0 min. (0 % B, 0,6 ml/min); 10 min. (40 % B, 0,6 ml/min); 15 min. (50 % B, 0,6 ml/min); 20 min. (60 % B, 0,5 ml/min); 30 min. (70 % B, 0,4 ml/min); 45 min. (86 % B, 0,3 ml/min); 50 min. (85 % B, 0,7 ml/min); 60 min. (85 % B, 0,8 ml/min).

Tabla 0.11. Relaciones de Áreas de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular determinados por HPLC.

Compuesto:	1	2	3	4	5	6	7	Valor medio en vinos blancos (1)
1/6	>8,00	3,54	1,38	>8,00	4,35	>8,00	14,26	4,11 ± 1,60
2/1	1,11	0,62	0,39	0,62	0,95	0,00	0,68	1,64 ± 0,59
2/5	7,09	1,23	0,52	3,16	2,90	0,87	3,37	1,63 ± 1,04
3/5	1,09	0,49	0,52	0,88	0,66	0,42	0,76	0,23 ± 0,08
4/5	<0,25	0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0,42 ± 0,17
5/6	>8,00	1,79	1,35	1,42	2,51	2,87	<0,25	2,60 ± 0,55

(1) Según Gumez-Cardovés y col. 1983.

Compuesto 1	Peruill-tartaril ester
2	p-hidroxicinamyl ester
3	ác. cafeico
4	ác. p-hidroxi cinámico (isómero cis)
5	ác. p-hidroxi cinámico (isómero trans)
6	ác. ferúlico

por Gómez-Cordovés y col., 1983, en vinos blancos españoles. Destaca la ausencia del isómero cis del ácido p-hidroxicinámico en todas las muestras excepto en la 2 en la que se encuentra en muy pequeña cantidad. Las relaciones existentes entre los compuestos son similares a las encontradas en vinos blancos, con excepción de aquellas en las que interviene el éster del ac. feruliltartárico.

6.4 CONCLUSIONES.

- 1/ El KHT es la sal mayoritaria detectada en los depósitos tartáricos.
- 2/ Cuando la precipitación se produce durante la fermentación o almacenamiento de los vinos precipitan pequeñas cantidades de tartrato cálcico.
- 3/ No se puede detectar ningún catión que precipite preferentemente junto al KHT.
- 4/ En los depósitos de fermentación y almacenamiento de vinos hay menos carbono en el precipitado que el estequiométricamente necesario para neutralizar la carga de los cationes, potasio y calcio; al contrario de lo que ocurre cuando la precipitación del KHT tiene lugar con ayuda del frío.
- 5/ Se ha detectado la presencia de proteínas y de polifenoles en todas las muestras de tartratos. La cantidad de polifenoles y su grado de polimerización, es mayor en los tartratos procedentes de la estabilización por frío que en el resto de las muestras.

CAPITULO 7

ESTUDIO DE LOS INHIBIDORES DE LA CRISTALIZACION DEL KHT MEDIANTE TECNICAS DE CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR Y ELECTROFORESIS.

RESUMEN

En el capitulo anterior se ha estudiado la composición de los precipitados tartáricos, discutiéndose su fórmula estequiométrica. En este capitulo se estudian los mismos sedimentos prestando especial atención a las sustancias de alto peso molecular. Las técnicas empleadas han sido Cromatografía de exclusión molecular y electroforesis. La primera se ha utilizado para fraccionar los compuestos según su peso molecular; y la electroforesis para la caracterización de la fracción proteica.

7.1 INTRODUCCION.

Las sustancias a las que tradicionalmente se les responsabiliza de los fenómenos de inhibición de la precipitación del KHT en el vino, son compuestos de alto peso molecular y naturaleza coloidal (Berg y Keefer, 1958; Píllone y Berg, 1965; Usseglio-Tomasset, 1976, 1979; 1982; Brugirard, 1979; Usseglio-Tomasset, 1982; Colagrande y col 1985) junto con algunos cationes (Berg y Keefer, 1958; Koch y Schiller, 1964). Este conocimiento se ha adquirido por las mejoras obtenidas en la estabilización por frío cuando al vino se le somete previamente a tratamientos desproteinizantes y por el estudio sobre soluciones modelo de KHT en agua-alcohol donde se introducen los supuestos inhibidores a modo de impurezas observándose una ralentización de la precipitación (Cantarelli, 1964, Maujean y col., 1985 y 1986).

Debido a que los compuestos buscados son muy minoritarios en las muestras de partida, ha sido necesario en algunos casos hacer una extracción y posterior concentración de los mismos para su análisis. Aún así, algunas veces la posibilidad de detectar en los mismos la presencia de compuestos concretos es remota, por lo que se ha enfocado el estudio al conocimiento de la participación de las familias de compuestos en los precipitados.

7.2 MATERIALES Y METODOS.

7.2.1 Muestras.

Las muestras analizadas por cromatografía de exclusión molecular han sido la muestra 5 y 6 de las estudiadas en el capítulo 6 y detalladas en la Tabla 6.1.

La fracción proteica se ha analizado en todas las muestras detalladas en la Tabla 6.1.

7.2.2 Preparación de la muestra.

7.2.2.1 Preparación de la muestra para cromatografía de exclusión molecular.

Se disuelve 1 Kg de KHT en la menor cantidad posible de agua, se ajusta a pH 6 con KOH 4N, para que el tartárico esté mayoritariamente como ión tartrato, se añade CaCl_2 , para formar tartrato cálcico y se separa el precipitado por filtración sobre papel. Este proceso se repite varias veces recogiendo las soluciones filtradas que serán las muestras con las que se va a trabajar.

7.2.2.2 Preparación de la muestra para el análisis electroforético.

300 ml de muestra disuelta en HCl 0.1 N en la proporción de 10 gr/l, se dializan y se concentran en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 5.3.19.

7.2.3 Fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular.

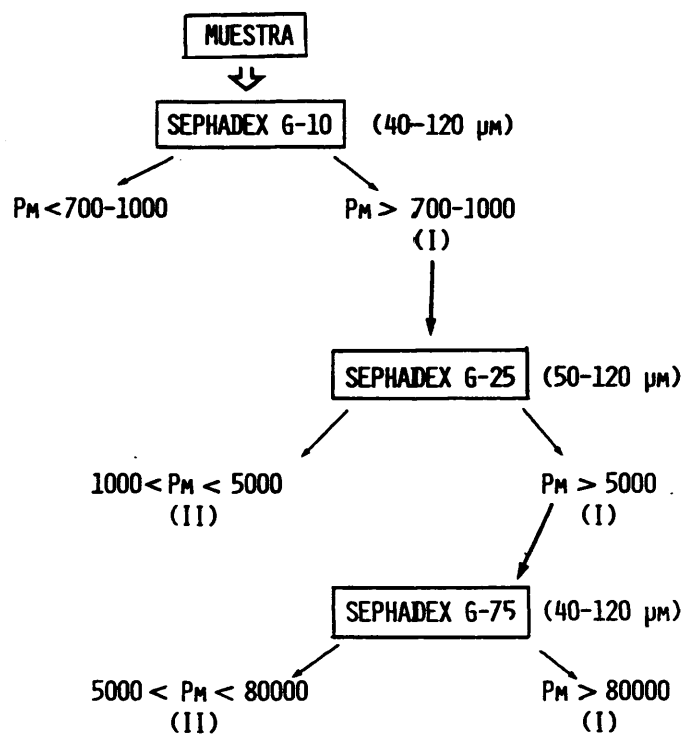
La solución obtenida se sometió a un fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular, siguiendo el esquema de la Figura 7.1. Se han utilizado columnas de vidrio de Pharmacia (Upsala, Suecia), rellenas de gel de dextrano reticulado de distinto tamaño de poro. Las dimensiones de las columnas y las condiciones cromatográficas se resumen en la Tabla 7.1. A la salida de la columna se ha medido la absorbancia a 280 nm., utilizando un detector Uvicord LKB modelo 2210. En todos los casos el volumen de exclusión de las columnas se ha medido con azul dextrano. El eluido se ha recolectado en fracciones de 4 ml. utilizando un colector de fracciones Redirac de LKB, modelo 2112. En cada una de las fracciones se ha medido la absorbancia a 320, 265 y 254 nm. con un espectrofotómetro Beckman modelo 25.

7.2.4 Determinación de polifenoles totales.

Se ha seguido el método propuesto por Singleton y Rossi (1965), descrito en el apartado 5.3.14.

7.2.5 Determinación de nitrógeno amínico.

Se ha realizado según el método propuesto por Saifer y col. (1960), basado en la formación de un complejo coloreado del grupo amino terminal de los aminoácidos con la ninhidrina y lectura de la absorbancia a 595 nm.. Para construir la curva de calibrado se ha



ESQUEMA DEL FRACCIONAMIENTO DE LA MUESTRA

Figura 7.1. Esquema del fraccionamiento de las muestras de tartratos por cromatografía de exclusión molecular.

Tabla 7.1. Dimensiones de las columnas y condiciones cromatográficas utilizadas en el fraccionamiento de las muestras de tartratos.

	Sephadex G-10	Sephadex G-25	Sephadex G-75
Dimensiones de la columna	95 x 2,6 cm.	65 x 2,6 cm.	65 x 2,6 cm.
Altura del lecho cromatográfico	74 cm.	61 cm.	52 cm.
Eluyente	ác. acético 3%	ác. acético 3%	ác. acético 3%
Flujo	150 ml/h	150 ml/h	90 ml/h

utilizado leucina como patrón. En estas condiciones no se valora la prolina por lo que no está incluida en el dato del nitrógeno amínico.

7.2.6 Determinación de proteínas.

Se ha realizado según el método de Bradford (1976), detallado en el apartado 5.3.20.

7.2.7 Hidrólisis de proteínas.

Se ha realizado en ampollas de vidrio, en medio clorhídrico 6N, a vacío y 110°C durante 24 horas. Los hidrolizados se concentraron en el rotavapor y se lavaron varias veces con agua para eliminar el exceso de clorhídrico, antes de determinar el nitrógeno amínico.

7.2.8 Detección de nucleótidos.

Su presencia se ha determinado por el análisis de ribosa que se ha realizado por la formación de un complejo coloreado con el orcinol en medio ácido, en presencia de FeCl_3 y medida de la absorbancia a 670 nm.

7.2.9 Detección de pectinas.

Su presencia se ha determinado por la reacción de los ácidos urónicos y el carbazol en medio sulfúrico caliente y medida de la absorbancia a 530 nm. Para construir la curva de calibrado se ha utilizado ácido galacturónico.

7.2.10 Electroforesis sobre gel de poliacrilamida con y sin agentes desnaturizantes.

Se ha realizado según las condiciones descritas en los apartados 5.3.21 y 5.3.22.

7.2.11 Isoelectroenfoque.

Se ha seguido el método descrito en el apartado 5.3.23.

7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.3.1 Tartratos procedentes de depósitos de fermentación de mostos.

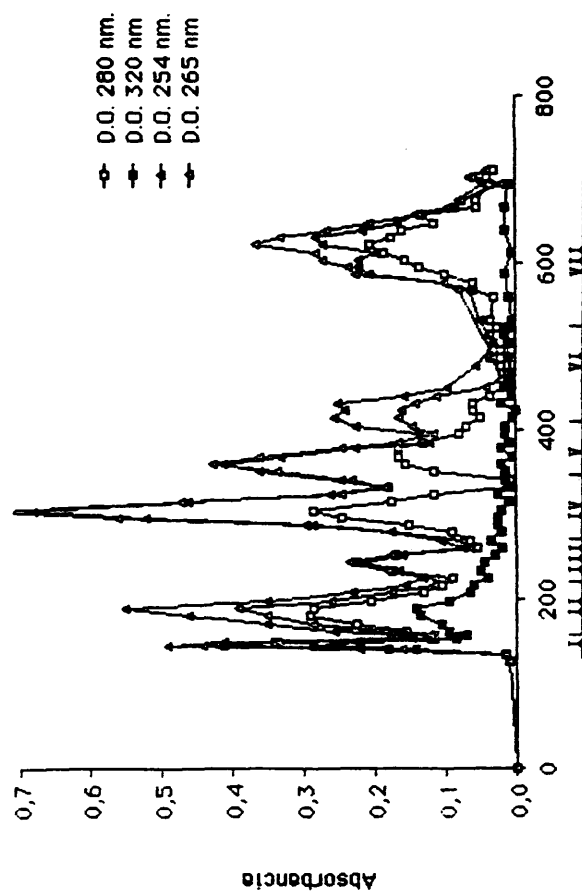
Cromatografía sobre Sephadex G-10.

Los cromatogramas a las distintas longitudes de onda, correspondientes al fraccionamiento de la muestra por paso a través de la columna de Sephadex G-10, se muestran en la Figura 7.2. Sobre el cromatograma obtenido a 280 nm. se ha representado, en la Figura 7.3, el contenido en los eluidos en nitrógeno amínico y polifenoles recogiendo en la Tabla 7.2 el contenido en estos compuestos en cada una de las fracciones en las que se agruparon los eluidos.

En el calibrado realizado en nuestro laboratorio de la columna de Sephadex G-10 (Gonzalez de Llano y col. 1987) se ha comprobado que en el primer pico eluyen los compuestos de peso molecular mayor de 700 daltons aproximadamente. En el segundo pico eluyen la mayoría de los aminoácidos junto con algunos péptidos, eluyendo en la fracción IV la fenilalanina y en las fracciones VI y VII la tirosina y el triptófano. El mayor retraso de estos aminoácidos se debe a la interacción hidrofóbica que tiene lugar entre los anillos aromáticos y el gel.

El porcentaje de nitrógeno amínico presente en la fracción II (Tabla 7.2) es 90,13 % del total. Colagrande y Silva (1981) al pasar un vino blanco por una columna de las mismas características que la utilizada por nosotros, obtienen el 92 % del nitrógeno amínico del vino en el segundo pico, pero no detectan los correspondientes a la tirosina y el triptófano. Este hecho podría indicar que estos aminoácidos se adsorben preferentemente en los tartratos.

Los polifenoles aparecen en todas las bandas, aunque en menos concentración en la IV y VII.



Volumen de elución (ml)

Figura 7.2. Curvas de elución sobre Sephadex G-10, de la fracción soluble a pH 6 de tartratos procedentes de depósitos de fermentación (muestra no5). Condiciones cromatográficas: Altura del lecho: 74 cm., Diámetro interno: 2,6 cm., Eluyente Ac. acético 3 %. Flujo: 150 ml/h.

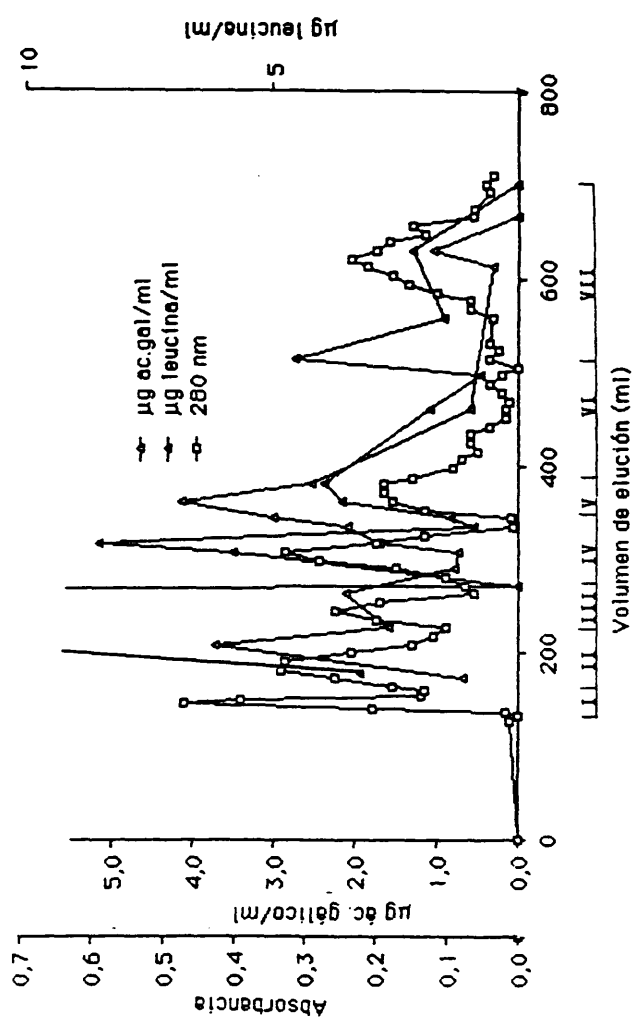


Figura 7.3. Polifenoles totales y aminoácidos libres del eluido sobre Sephadex G-10 de la fracción soluble a pH 6 de tartratos procedentes de depósitos de fermentación (muestra nº 5).

Tabla 7.2. Composición de las bandas eluidas sobre Sephadex G-10, G-25 y G-75, de la fracción soluble a pH 6, de los tartratos procedentes de depósitos de fermentación.

Sephadex	Banda	Polífenoles totales (μg ác. gálico)	Nitrógeno amínico (μg) (*)	(**)	Proteínas (μg BSA)
G-10	II	283,5	2316	-	-
	III	184,5	0	-	-
	IV	67,3	15	-	-
	V	426,4	17	-	-
	VI	286,7	53	-	-
	VII	63,1	63	-	-
G-25	II	368,4	47	679	0
G-75	I	42,5	24	-	105
	II	260,2	35	540	0
(*) antes de la hidrólisis					
(**) después de la hidrólisis					

Es de destacar la elevada absorción a 265 nm. de todas las bandas. Bayly y Berg (1967), Sommers y Ziemelis (1972) y Feuillat y Morfaux (1976), relacionan la absorción a 265 nm. en vinos con la presencia de nucleótidos e Interesse y col. (1987), indican como posible la presencia de material nucleotídico cuando la relación de absorciones a 280/254 nm es menor de 3, como ocurre en este caso. Para comprobar si efectivamente hay nucleótidos se ha realizado la determinación de ribosa en los eluidos, siendo el resultado negativo. Debido también a que los nucleótidos están en los vinos en pequeña concentración (Feuillat y col., 1977) la absorción a 265 nm. se debe exclusivamente a compuestos fenólicos.

La elución en forma de picos bien definidos, la coincidencia en los máximos de absorción a las distintas longitudes de onda (Figura 7.2) hacen pensar en la existencia de complejos moleculares.

El primer pico está compuesto por las especies químicas de peso molecular superior a 700 daltons. Este pico está formado, probablemente, por asociaciones de varias especies químicas y se ha estudiado por cromatografía sobre gel de dextrano Sephadex G-25 y G-75.

Cromatografía sobre Sephadex G-25.

Al pasar la fracción que eluye en el volumen de exclusión de la columna de Sephadex G-10, por una columna conteniendo Sephadex G-25, en las condiciones cromatográficas recogidas en la Tabla 7.1, se ha obtenido el cromatograma que se muestra en la Figura 7.4. Está formado por dos picos de volumen de elución muy próximos, cuyo máximo de

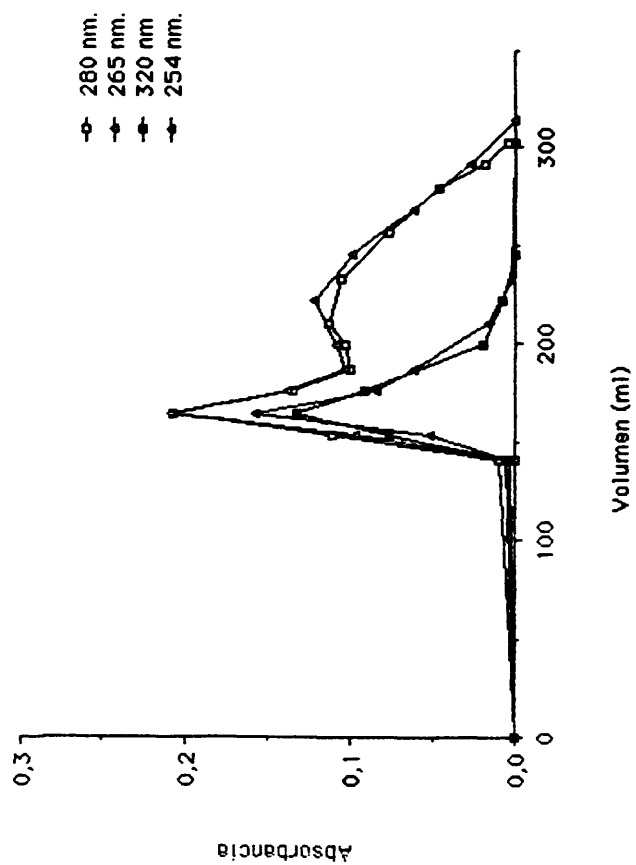


Figura 7.4. Curvas de elución sobre Sephadex G-25, de la fracción I del eluido de la
Figura 7.2. Condiciones cromatográficas: Altura del lecho: 61 cm.,
Diámetro interno: 2,6 cm., Eluyente Ac. acético 3 %. Flujo: 150 ml/h.

absorbancia corresponde a 280 y 265. en los dos picos destacando la absorbancia prácticamente nula a 254 y 320 nm. en el segundo pico.

El primer pico corresponde a las sustancias de peso molecular mayor de 5000 daltons. Las fracciones correspondientes a este primer pico se reservaron para fraccionarlas por cromatografía sobre Sephadex G-75. El segundo pico eluye en el volumen correspondiente a los compuestos de 2500 daltons. Por la proporción de nitrógeno amínico antes y después de la hidrólisis (Tabla 7.2) y supuesto un peso molecular medio de 100 daltons por aminoácido, calculamos que contiene péptidos de 1500 daltons. También contiene una gran cantidad de polifenoles (18,78 % del total), que suponemos asociados a los péptidos e interaccionan con la fase estacionaria, retrasando su volumen de elución.

Cromatografía sobre Sephadex G-75.

Las fracciones correspondientes al volumen de exclusión de la columna de Sephadex G-25, al pasarlos por una columna de Sephadex G-75, en las condiciones indicadas en la Tabla 7.1 da lugar a dos picos muy separados uno de otro, como se muestra en la Figura 7.5.

El primer pico eluye prácticamente en el volumen de exclusión con un peso molecular aproximado de 80000 daltons. Es el único pico que contiene proteínas (Tabla 7.2) y contiene el 2 % del total de los polifenoles de la muestra. El segundo pico contiene péptidos de peso molecular en torno a los 2500 daltons y polifenoles, 13,24 % del total.

Como resumen de estos resultados, se puede decir que entre los compuestos que acompañan al KHT procedente de depósitos de

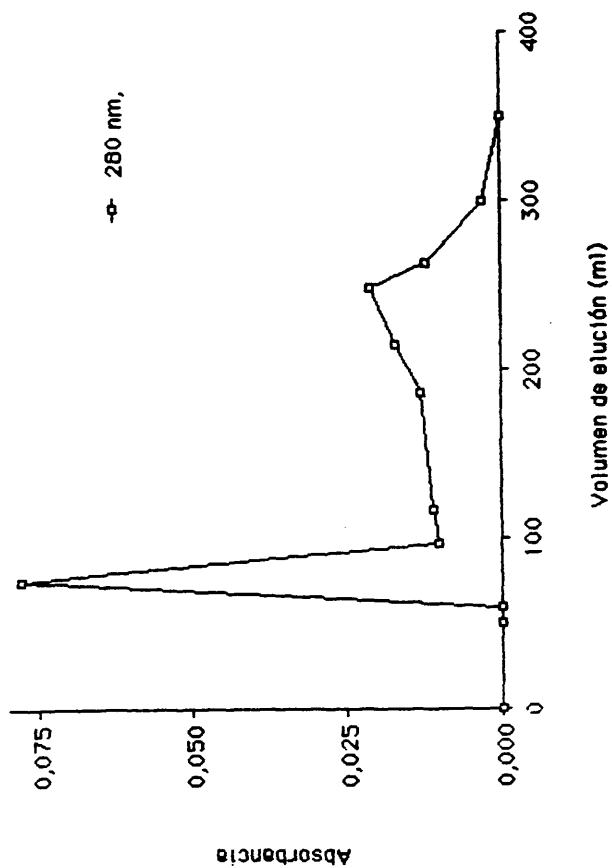


Figura 7.5. Curva de elución sobre Sephadex G-75, de la fracción I del eluido de la
Figura 7.4. Condiciones cromatográficas: Altura del lecho: 52 cm.,
Diámetro interno: 2,6 cm., Eluyente: Ac. acético 3 %, Flujo: 90 ml/h.

fermentación, se han detectado polifenoles, aminoácidos libres, péptidos y proteínas. No se ha detectado cantidades apreciables de ribosa aunque no se debe descartar la presencia de nucleótidos, dada la fuerte absorción a 265 nm. de los eluidos. El 65 % de los polifenoles eluye con la fracción de peso molecular menor de 700 daltons; el 19 % con la de peso molecular comprendido entre 700 y 5000 daltons, el 13 % entre 5000 y 80000 y un 2 % con la fracción proteica, mayor de 80000 daltons.

7.3.2 Tartratos procedentes de depósitos de estabilización por frío.

Cromatografía por Sephadex G-10.

El cromatograma a las distintas longitudes de onda, correspondientes al fraccionamiento de esta muestra por paso a través de la columna de Sephadex G-10, se muestra en la Figura 7.6. En la Figura 7.7 se ha representado sobre el cromatograma a 280 nm. el contenido en nitrógeno amínico y polifenoles de los eluidos, recogiendo en la Tabla 7.3 el contenido en estos compuestos en cada una de las fracciones en las que se han agrupado los eluidos.

La fracción que presenta el mayor contenido en nitrógeno amínico es la II, donde eluyen casi todos los aminoácidos a excepción de los aromáticos. La fracción IV aparece en forma de meseta, corresponde al volumen de elución de los aminoácidos aromáticos y representa el 9,41 % del nitrógeno amínico total.

Los polifenoles aparecen en las bandas II y IV, representando el 8,13 y 2,47 % respectivamente. En la fracción III únicamente se detectan polifenoles a nivel de trazas.

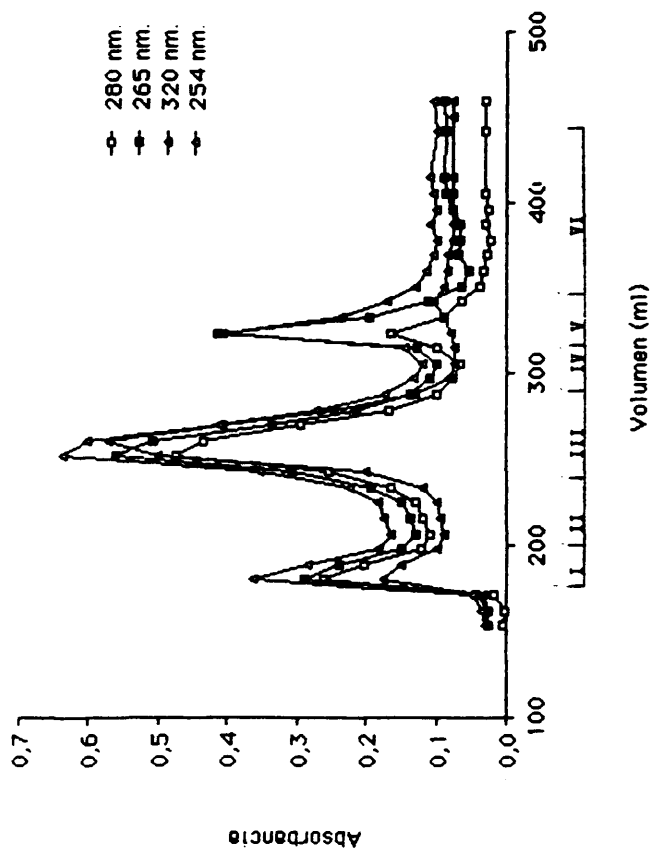


Figura 7.6. Curvas de elución sobre Sephadex G-10, de la fracción soluble a pH 6 de tartratos procedentes de depósitos de estabilización por frío (muestra nº 6), en las mismas condiciones cromatográficas que las detalladas en la Figura 7.2.

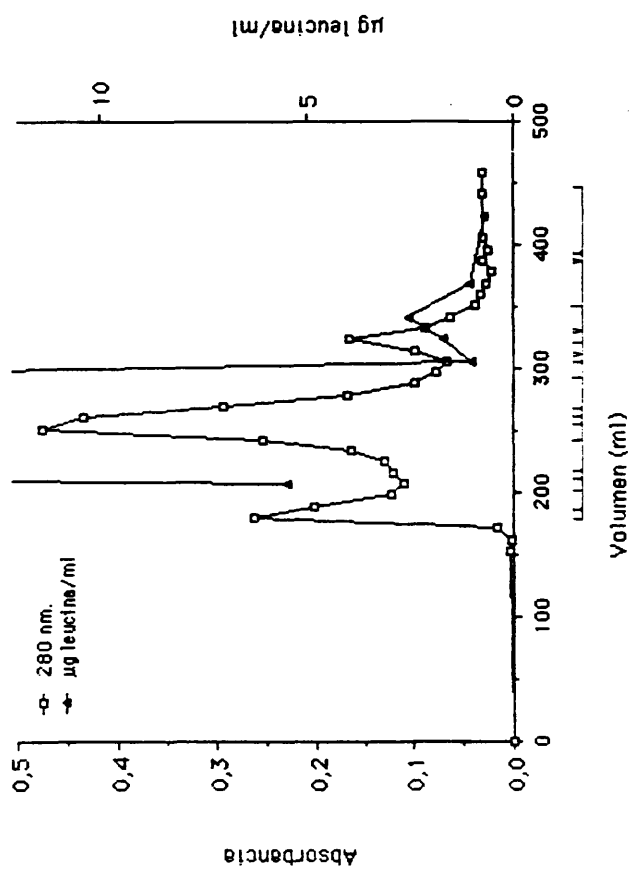


Figura 7.7. Aminoácidos libres del eluido sobre Sephadex G-10 de la fracción soluble a pH 6 de tartratos procedentes de depósitos de estabilización por frío (muestra nº 6).

Tabla 7.3. Composición de las bandas eluidas sobre sephadex G-10, G-25 y G-75, de la fracción soluble a pH 6, de tartratos procedentes de depósitos de estabilización por frío.

Sephadex	Banda	Polífenoles totales (µg ác. gálico)	Nitrógeno amínico (*)	Nitrógeno amínico (**)	Proteína (µg BSA)
G-10	II	trazas	30	-	-
	III	17,9	71	-	-
	IV	-	9	-	-
	V	trazas	1	-	-
	VI	5,4	18	-	-
G-25	II	186,2	58	2104	-
G-75	I	-	-	-	130
	II	10,0	4	104	0
(*) antes de la hidrólisis					
(**) después de la hidrólisis					

La fuerte absorción de los eluidos a 265 nm. podría indicar, como se ha comentado para el caso de la muestra anterior, la presencia de material nucleotídico pero la ausencia de ribosa no nos permite confirmarlo por lo que suponemos que la absorción a 265 nm. es debida exclusivamente a compuestos fenólicos.

La coincidencia en los máximos de absorción a las distintas longitudes de onda, permite suponer que hay asociaciones moleculares.

La banda que eluye en el volumen de exclusión de esta columna, corresponde a las sustancias de peso molecular superior a 700 daltons y se ha estudiado por cromatografía sobre Sephadex G-25 y G-75.

Cromatografía por Sephadex G-25.

El eluido correspondiente al volumen de exclusión de la columna de Sephadex G-10, se pasó por una columna de Sephadex G-25, en las mismas condiciones cromatográficas recogidas en la Tabla 7.1. El cromatograma obtenido midiendo la absorbancia a 280 nm. se recoge en la Figura 7.8. En ella se observan dos picos: el primero de ellos, que corresponde a las sustancias de peso molecular mayor de 5000 daltons, se reserva para fraccionarlo por cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex G-75.

La segunda banda está formada por polifenoles y péptidos. Tanto por el volumen de elución como por la relación de nitrógeno amínico antes y después de la hidrólisis, Tabla 7.3, se le atribuye un peso molecular aproximado de 4000 daltons.

Al comparar este último pico con el correspondiente a la muestra procedente de depósitos de fermentación (Tabla 7.2), vemos que en los dos picos nos encontramos péptidos y polifenoles, sin embargo la

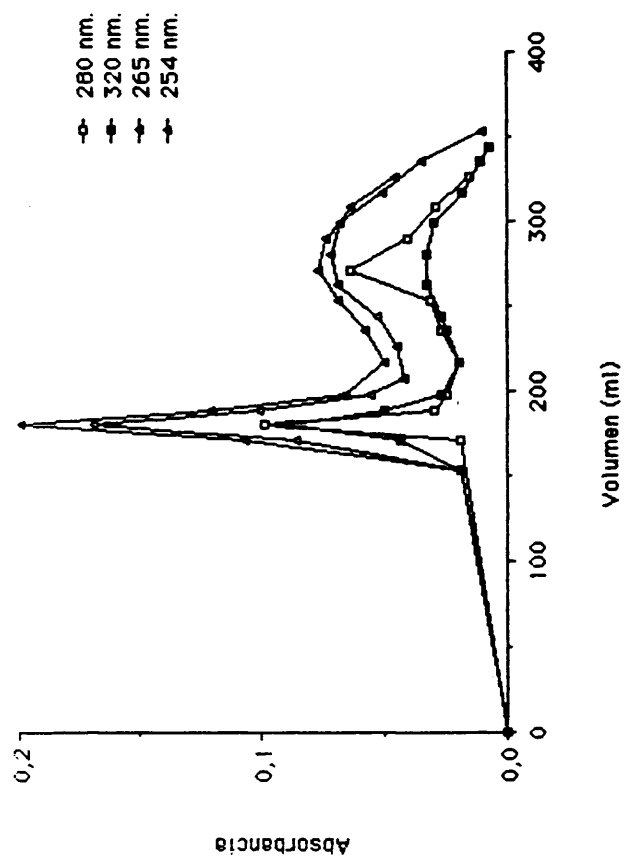


Figura 7.6. Curvas de elución sobre Sephadex G-25, de la fracción I del eluido de la Figura 7.6, en las mismas condiciones cromatográficas que las detalladas en la Figura 7.4.

contribución relativa de ambos es distinta. En la primera muestra los péptidos tienen un tamaño de unos 15 aminoácidos frente a los casi 37 de la segunda, sin embargo, aquella tiene el doble de polifenoles que esta. La coincidencia en los tamaños moleculares puede ser descartada en favor de un complejo mixto de péptidos y compuestos fenólicos. La mayor contribución de los polifenoles en los tartratos procedentes de la fermentación, explica el volumen de elución semejante al de los tartratos procedentes de la estabilización por frío, a pesar de que está constituido por péptidos de mayor tamaño.

Cromatografía por Sephadex G-75.

La fracción correspondiente al volumen de exclusión de la columna de Sephadex G-25, se pasó por una columna de Sephadex G-75, en las condiciones cromatográficas recogidas en la Tabla 7.1. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 7.9, donde se pueden observar dos picos. Al primero, que aparece en el volumen de exclusión, se le atribuye un peso molecular aproximado de 80000 daltons. Al segundo pico se le atribuye, por su volumen de elución, un peso molecular aproximado de 4000 daltons.

Los análisis efectuados a estas fracciones, se muestran en la Tabla 7.3, y se puede ver que están formados por proteínas, péptidos y polifenoles.

Como resumen del análisis de esta muestra procedente de depósitos de estabilización por frío, se puede decir:

- El 10 % de los polifenoles eluye con la fracción de peso molecular menor de 700 daltons, el 85 % eluye con un peso

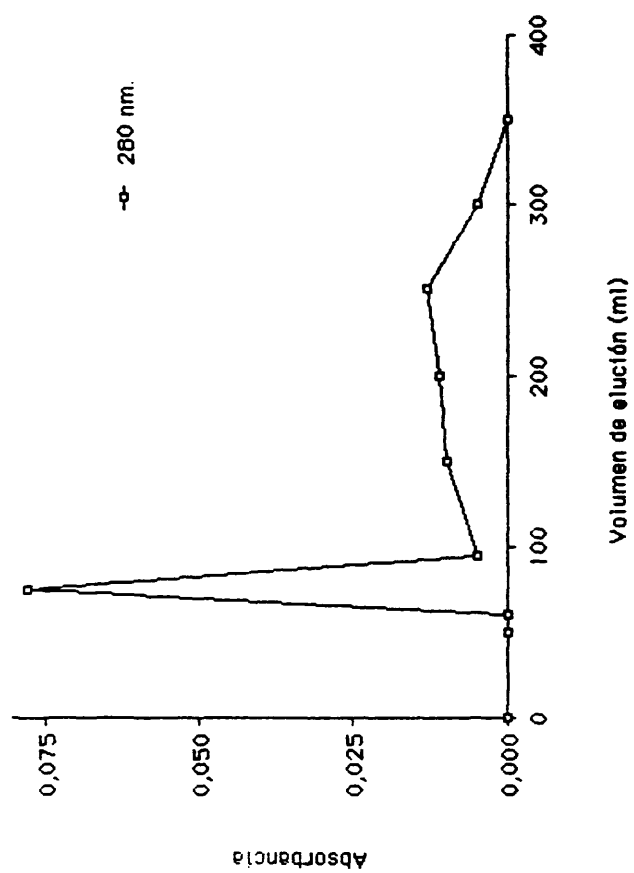


Figura 7.0. Curvas de elución sobre Sephadex G-75, de la fracción 1 del eluido de la Figura 7.6, en las mismas condiciones cromatográficas que las detalladas en la Figura 7.5.

molecular comprendido entre 700 y 5000 daltons y el 5 % restante entre 5000 y 80000 daltons.

- Los péptidos tienen un peso molecular aproximado de 4000 daltons, destacando al menos dos complejos moleculares (el segundo pico en las Figuras 7.8 y 7.9) con distinta participación de polifenoles lo que permite su separación.

La comparación de estos resultados con los correspondientes a la muestra procedente de los depósitos procedentes de la fermentación, permite destacar varias diferencias.

Por un lado la distinta distribución del nitrógeno amínico, que parece estar más repartido en la muestra procedente de la estabilización por frío, con mayor contribución de aminoácidos aromáticos y mayor participación de los péptidos de peso molecular comprendido entre 700 y 5000 daltons.

Por otro lado, la distribución de los polifenoles también es distinta. En la muestra de los tartratos procedentes de los depósitos de estabilización por frío, el 85 % de los polifenoles eluye en el volumen correspondiente a los pesos moleculares comprendidos entre 700 y 5000 daltons mientras que en la muestra procedente de los depósitos de fermentación esta fracción solo representa el 19 %. En ambos casos péptidos y polifenoles eluyen conjuntamente, por lo que parece más lógico pensar en asociaciones entre ambas sustancias que en coincidencia de pesos moleculares.

La clasificación de los polifenoles atendiendo a su peso molecular en estas muestras coincide con la obtenida en los tartratos analizados anteriormente.

Como resumen de estos análisis podemos decir que durante la precipitación del KHT, tanto cuando se produce espontáneamente como cuando se provoca con ayuda del frío, precipitan aminoácidos, péptidos, proteínas y polifenoles.

Cuando la precipitación es espontánea, la distribución de los aminoácidos que acompañan al KHT es aproximadamente la misma que la existente en los vinos, pero cuando la precipitación se provoca con ayuda del frío hay una mayor contribución de aminoácidos aromáticos, péptidos, y de polifenoles de peso molecular comprendido entre 700 y 5000 daltons. Esta fracción polifenólica se presenta asociada con los péptidos.

7.3.3 Estudio electroforético de la fracción proteica presente en los tartratos.

Las cantidades de proteína presentes en los tartratos se muestran en la Tabla 7.4, expresadas en % sobre la muestra sólida. También se muestra la significación del nitrógeno proteico respecto al nitrógeno total. Al comparar este dato con el correspondiente a los mostos y vinos estudiados (Tabla 5.10), se observa que es mayor en la muestra de tartratos lo que pone de relieve la participación de las proteínas en la formación de los depósitos tartáricos.

Por electroforesis en gel de poliacrilamida sin agentes desnaturalizantes, en las muestras de tartratos procedentes de depósitos de fermentación y almacenamiento de vinos (muestras 1 a 5), solo se detectan 2 bandas muy cercanas entre sí que avanzan con el frente, es decir, de movilidad próxima a 1. Probablemente, esta elevada densidad de carga hace que tengan muchas posibilidades de

Tabla 7.4. Contenido en nitrógeno total y nitrógeno proteico de la
muestras de tartratos.

Muestra	% proteína	% N _{proteico}	% N _{total}	% N _{proteico} /N _{total}
1	0,022	0,0035	0,10	3,52
2	0,051	0,0082	0,12	6,83
3	0,013	0,0021	0,16	1,31
4	0,053	0,0085	0,18	4,72
5	0,011	0,0018	0,24	0,75
6	0,064	0,0102	0,28	3,64
7	0,058	0,0093	0,25	3,72

interacción iónica con los cristales de KHT. Esto, junto al hecho de no ser detectadas en los mostos ni en los vinos, indica que existe una precipitación preferente de las mismas simultanea a la del KHT. En las muestras 6 y 7, procedentes de depósitos de estabilización por frío aparecen además de estas bandas otras de movilidades coincidentes a las de los vinos (Tabla 7.5).

Tabla 7.5. Movilidad electroforética de las bandas separadas por PAGE y teñidas con Azul Coomassie G-250 en las muestras de tartratos procedentes de depósitos de estabilización por frío.

MUESTRAS:	Movilidades:								
	0,35	0,39	0,42	0,46	0,50	0,52	0,55	0,58	1,00
6	+	++	+	+++	+	+++	+	+	++
7	+	++	+	+++	+	+++	+	+	+

La distribución de pesos moleculares de las proteínas presentes en las muestras de tartratos (Tabla 7.6) es distinta de la de mostos y vinos. Las proteínas mayoritarias parecen agruparse en dos zonas, una de ellas de pesos moleculares comprendidos entre 10000 y 20000 daltons y la otra de 60000 a 80000 daltons.

La diferente distribución de pesos moleculares encontrada en las muestras de mostos y vinos podría relacionarse con la diferente estabilidad de las proteínas en función de su peso molecular.

Tabla 7.6. Distribución porcentual de las bandas separadas por PAGE-SDS y teñidas con Azul Coomassie R-250 en las muestras de tartratos.

Pesos moleculares (daltons x 10 ⁻³):								
	>80	79-70	69-60	59-50	49-40	39-30	29-20	19-10
NUESTRA:								
1	-	-	51,3	12,5	-	-	-	33,9
2	-	-	73,4	-	-	-	-	26,5
3	-	-	100,0	-	-	-	-	-
4	35,4	18,2	12,5	16,1	-	-	-	17,4
5	-	45,9	23,5	-	-	30,6	-	-
6	-	15,1	23,7	-	-	-	41,0	19,7
7	-	8,2	13,1	-	10,0	25,2	-	43,0

Heatherbell y col. (1985) indica que las proteínas comprendidas entre 15000 y 26500 daltons son las más inestables de las presentes en vino, sin embargo, Millies (1975) establece que las más inestables son de menor peso molecular.

No se aprecian diferencias en la distribución de los pesos moleculares de las proteínas de los tartratos según su distinta procedencia, lo que contrasta con los resultados obtenidos en la electroforesis sin agentes desnaturalizantes. Las dos únicas bandas obtenidas aplicando esta última técnica en algunas muestras de tartratos parecen ser una mezcla heterogénea de proteínas y el que tengan la misma movilidad bien podría ser por su asociación con otros compuestos cargados como los polifenoles, aunque esta es una hipótesis que tiene que ser confirmada.

Los puntos isoelectricos de las proteínas contenidas en los tartratos (Tabla 7.7) no se diferencian notablemente de las obtenidas a partir de mostos y vinos. Tampoco se detectan diferencias entre las muestras según su distinta procedencia.

7.4 CONCLUSIONES.

Del fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular y del estudio electroforético, se pueden destacar los siguientes resultados:

18) La distribución del nitrógeno amínico en las muestras estudiadas es distinta, con una mayor contribución de aminoácidos aromáticos en la muestra procedente de la estabilización por frío.

Tabla 7.7. Distribución porcentual de las bandas separadas por isoelectroenfoque y tefidas con Azul Coomassie G-250, de mostos y vinos varietales utilizados para la elaboración de cavas.

MUESTRA:	Puntos isoelectrónicos:					
	5,9-5,6	5,5-5,3	5,2-4,9	4,8-4,6	4,2-4,0	3,9-3,7
1	-	-	17,9	39,0	43,8	-
2	8,3	6,3	52,5	21,1	7,1	4,7
3	9,9	-	45,9	23,4	12,2	8,6
4	15,2	-	41,7	21,7	-	21,4
5	-	-	31,8	36,9	31,3	-
6	3,4	1,8	37,9	46,6	9,3	-
7	-	-	34,6	58,6	6,8	-

2a) Se han detectado péptidos con un peso molecular aproximado de 4000 daltons en las dos muestras analizadas. Es menor el contenido en péptidos de la muestra procedente de la estabilización por frío.

3a) La distribución de los polifenoles también es distinta. En la muestra de los tartratos procedentes de los depósitos de estabilización por frío, el 85 % de los polifenoles eluye en el volumen correspondiente a los pesos moleculares comprendidos entre 700 y 5000 daltons mientras que en la muestra procedente de los depósitos de fermentación esta fracción solo representa el 19 %. En ambos casos péptidos y polifenoles eluyen conjuntamente, por lo que parece más lógico pensar en asociaciones entre ambas sustancias que en coincidencia de pesos moleculares.

4a) El porcentaje de nitrógeno proteico respecto del total es mayor en los tartratos que en los mostos y en los vinos lo que pone de relieve la participación de las proteínas en la precipitación del bitartrato potásico, en los vinos.

5a. a) La densidad de carga de las proteínas que acompañan a los tartratos procedentes de depósitos de fermentación, almacenamiento y estabilización por frío de vinos es superior a la densidad de carga de las encontradas en mostos y vinos.

b) La distribución de pesos moleculares de las proteínas de los tartratos, independientemente de su procedencia, es distinta de la de mostos y vinos. Las proteínas mayoritarias parecen agruparse en dos zonas, una de ellas de pesos moleculares comprendidos entre 10000 y 20000 daltons y la otra de 60000 a 80000 daltons.

c) Los puntos isoelectricos de las proteínas mayoritarias que acompañan a los tartratos están comprendidos dentro del mismo rango que las de los mostos y los vinos.

CONCLUSIONES GENERALES

El trabajo recogido en esta Memoria, constituye una aportación original en los siguientes aspectos:

Estudio de la físico-química de las soluciones tartáricas:

18) El tamaño de grano de los cristales de bitartrato potásico utilizado en la operación de siembra no debe ser menor de 5 μm ., para no alterar la solubilidad y permitir una agitación eficaz.

28) La medida de la conductividad es un indicador fiable de la concentración de los iones en soluciones hidroalcohólicas y vinos y puede utilizarse para seguir la evolución de la concentración de potasio en la precipitación del bitartrato potásico.

38) El producto de concentraciones termodinámico no se puede emplear para el cálculo de la temperatura de saturación en bitartrato potásico de los vinos debido a la interferencia del resto de los componentes del vino.

Precipitación del bitartrato potásico en soluciones hidroalcohólicas y en vinos blancos utilizados para la elaboración de cava:

48) La precipitación del bitartrato potásico en soluciones hidroalcohólicas y en vinos con o sin siembra de cristales, es radicalmente distinta:

a) Sin siembra de cristales, existe un período de inducción anterior a la nucleación heterogénea y homogénea, la cual es seguida de crecimiento cristalino; en los vinos, la duración del período de inducción es mayor, la velocidad de precipitación es menor y la precipitación no es estequiométrica, lo que pone de manifiesto la

intervención de sustancias ajenas a los iones precipitantes. La agitación favorece la nucleación y el crecimiento, disminuyendo el período de inducción, pero en el caso de los vinos, un exceso de agitación produce un aumento del período de inducción, por lo que es necesario optimizar el proceso.

b) Con siembra de cristales, se produce en los primeros estadios del proceso, un descenso brusco de la concentración a causa de la nucleación secundaria inducida por los gérmenes; la temperatura de tratamiento es la variable más decisiva en el rendimiento de la precipitación del bitartrato potásico en vinos con siembra de cristales. En este caso, la precipitación del bitartrato potásico es estequiométrica.

Análisis morfológico y estructural de los cristales de bitartrato potásico:

5a) La estructura cristalina del bitartrato potásico y el estudio cinético realizado, permite definir a los iones potasio y bitartrato como unidades de crecimiento, pero sus cinéticas de integración en el cristal son diferentes. El ión potasio forma enlaces iónicos y se incorpora fácilmente al cristal, mientras que los iones bitartrato crean, además de los enlaces iónicos, puentes de hidrógeno con otros iones bitartrato y su incorporación al cristal está dificultada por impedimento estérico.

6a) El mecanismo de crecimiento cristalino del bitartrato potásico a partir de soluciones hidroalcohólicas y vinos es básicamente el mismo. Su cinética de crecimiento está limitada por el transporte de los iones bitartrato y su integración en la superficie del cristal.

Estudio de la composición de los mostos y los vinos base para la elaboración de cavas:

7a) Los vinos de la misma variedad, destinados a la elaboración de cavas presentan características muy similares, independientemente del año de la vendimia de que proceden. La concentración de proteína es menor de 10 mg BSA/l, en los mostos y menor de 2 mg BSA/l en los vinos. El nitrógeno proteico representa menos del 1 % del nitrógeno total en los mostos y menos del 0,2 % en los vinos. La movilidad electroforética de las proteínas es menor en los vinos que en los mostos. En ambos casos predominan las fracciones de peso molecular menor de 40000 daltons y punto isoelectrico comprendido entre 4,0 y 5,4.

Composición de tartratos procedentes de depósitos de fermentación, almacenamiento y estabilización por frío:

8a) Los tartratos que proceden de depósitos de fermentación, almacenamiento y estabilización por frío de los vinos contienen, junto al bitartrato potásico, pequeñas cantidades de tartrato cálcico, en cambio, en las muestras procedentes de la estabilización por frío de los vinos no se ha detectado tartrato cálcico. En todas las muestras se han detectado polifenoles, aminoácidos libres, péptidos y proteínas, pero la cantidad de polifenoles y su grado de polimerización, es mayor en los tartratos procedentes de depósitos de estabilización por frío que en el resto de las muestras. La composición del precipitado no es estequiométrica en ningún caso.

9a) La distribución del nitrógeno amínico en las muestras es distinta, con una mayor contribución de aminoácidos aromáticos en la muestra procedente de la estabilización por frío.

10a) Se han detectado péptidos con un peso molecular aproximado de 4000 daltons. Es menor el contenido en péptidos de la muestra procedente de la estabilización por frío.

11a) La distribución de los polifenoles también es distinta. En la muestra de los tartratos procedentes de los depósitos de estabilización por frío, el 85 % de los polifenoles eluye en el volumen correspondiente a los pesos moleculares comprendidos entre 700 y 5000 daltons mientras que en la muestra procedente de los depósitos de fermentación esta fracción solo representa el 19 %. En ambos casos péptidos y polifenoles eluyen conjuntamente, por lo que parece más lógico pensar en asociaciones entre ambas sustancias que en coincidencia de pesos moleculares.

12a) El porcentaje de nitrógeno proteico respecto del total es mayor en los tartratos que en los mostos y en los vinos lo que pone de relieve la participación de las proteínas en la precipitación del bitartrato potásico en los vinos.

Estudio electroforético de las proteínas que acompañan a los tartratos:

13a. a) La densidad de carga de las proteínas que acompañan a los tartratos procedentes de depósitos de fermentación, almacenamiento y estabilización por frío de vinos es superior a la densidad de carga de las encontradas en mostos y vinos.

b) La distribución de pesos moleculares de las proteínas de los tartratos, independientemente de su procedencia, es distinta de la de mostos y vinos. Las proteínas mayoritarias se agrupan en dos zonas, una de ellas de pesos moleculares comprendidos entre 10000 y 20000 daltons y la otra de 60000 a 80000 daltons.

c) Los puntos isoelectricos de las proteínas mayoritarias que acompañan a los tartratos están comprendidos dentro del mismo rango que las de los mostos y los vinos.

Del análisis de la composición y morfología de los tartratos precipitados en los vinos podemos deducir que las proteínas de alta densidad de carga son agentes inhibidores del crecimiento y bloquean la precipitación del bitartrato potásico, siendo responsables de la presencia de sobresaturación residual después de los procesos de estabilización. La siembra de cristales de bitartrato potásico, reduce la interferencia de estos compuestos, pero no consigue eliminar la sobresaturación residual.

BIBLIOGRAFIA.

- Amerine, M.A., Ough, C.S., 1976. Analisis de vinos y mostos. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Alonso, A., Gascó, B. S. 1987. The use of separator isoelectric focusing in microultrathin polyacrylamide gels in the characterization of some polymorphic proteins of forensic science significance. *J. Forensic Sci.* 32: 1558 - 1564.
- Anelli, G. 1977. The proteins of musts. *Am. J. enol. Vitic.* 28: 200 - 203.
- Baily F.C., Berg, H.W., 1967. Grape and wine proteins of white wine varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* 18: 18 - 32.
- Balakian, S., Berg, H.W., 1968. The role of polyphenols in the behaviour of potassium bitartrate in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 19: 91-100.
- Baranowski, J.D., Nagel, C.W., 1981. Isolation and identification of the hydroxycinnamic acid derivatives in white Riesling wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 32: 5-13.
- Baronnet, A. 1982. Ostwald ripening in solution, the case of calcite and mica. *Est. Geológicos*, 32: 185-198.
- Bennema, P., van der Eerden, J. P., 1977. Crystal growth from solution: Development in computer simulation. *J. Cryst. Growth*, 42: 201-213.
- Berg, H.W., Keefer, R.M., 1958. Analytical determination of tartrate stability in wine. I.- Potassium bitartrate. *Am. J. Enol. Vitic.* 9: 180-193.
- Berg, H.W., Keefer, R.M., 1959. Analytical determination of tartrate stability in wine. II. Calcium tartrate. *Am. J. Enol. Vitic.* 10: 105-109.
- Berg, H.W. De Soto, R.T., Akiyoshi, M., 1968. The effect of refrigeration, bentonite, clarification and ion exchange on potassium behavior in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 19: 208-212.
- Bidan, P., 1975. Les vins mousseux. Synthèse bibliographique 7. Ed. C.D.I.U.P.A.. Paris.
- Bidan, P., Feuillat, M., Moulin, J.-Ph., 1986. Les vins mousseux et pétillants. Techniques d'élaboration et appréciation de la qualité. Rapport de la France. *Bull. O.I.V.*, 563-564: 563-626.
- Blakesley, R.W., Boezi, J.A., 1977. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gel using Coomassie Brilliant Blue G - 250. *Anal. Biochem.* 82: 580 - 582.

Blouin, J., Guimbertau, G., Audouit, P., 1979. Prevention des précipitations tartriques dans les vins par le procede par contact. *Conn. Vigne Vin.*, 13: 149-169.

Blouin, J., Desenne, A., 1983. Essai d'un appareil de traitement des vins par le froid en continu. *Conn Vigne Vin.* 12: 137-150.

Boehringer Mannheim S.A. Metodos enzimáticos. 1971.

Boehringer Mannheim S.A. Metodos enzimáticos. 1975.

Boehringer Mannheim S.A. Metodos enzimáticos. 1986.

Boletín Oficial del Estado. 11 de Abril de 1972. Decreto 835/1972, por el que se aprueba el reglamento de la Ley 25/1970 "Estatuto de la Vitis, del Vino y de los Alcoholes".

Boletín Oficial del Estado. 8 de Agosto de 1972. Orden de 27 de Julio de 1972 por la que se reglamentan los vinos espumosos naturales y los vinos gasificados.

Bori, J.L., 1986. Les vins mousseux et pétillants. Techniques d'elaboration et appréciation de la qualité. Rapport de l'Espagne. *Bull. O.I.V.*, 663-664: 549-562.

Boulton, R., 1980. The relationship between total, titratable acidity and pH in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 76-80.

Boulton, R., 1980. The general relationship between potassium, sodium and pH in grape juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 182-186.

Boulton, R., 1980. A hypothesis for the presence, activity and role of potassium/hydrogen, adenosine triphosphatases in grape wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 283-287.

Bourne J.R., Davey, R.J., 1976. The role of solvent-solute interactions in determining crystal growth mechanism from solution. I. The surface entropy factor. *J. Cryst. Growth*, 35: 278-293.

Bradford, K.K., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 - 255.

Brugirard, A., 1979. Filtration sterile et précipitations de sels tartriques. *Rev. Franc. Enol.* 73: 49-59.

Bujac, P.D.B., 1976. Attrition and secondary nucleation in agitated crystal slurries. In "Industrial Crystallization": 23-32. Edited by J.W. Mullin. Plenum Press. New York.

Burnett, J., 1982. 20 ans d'evolution des techniques de stabilisation au froid. *Rev. Franc. Enol.*, 82: 103-104.

Burton, V.K., Cabrera, M., Frank, P.C., 1950. The growth of crystals and the equilibrium structure of their surfaces. *Phil. Trans. Royal Soc.*, 243: 299-358.

Buschmann, J., Luger, P., 1985. Structure of Potassium Hydrogen (+)-tartrate at 100°K, $K-C_4H_5O_6$. *Acta Cryst. C*:41:206-8.

Cabezudo, M.D., Polo, M.C., Herraiz, M., Reglero, G., Gonzalez-Raurich, M., Cáceres, I., Martín-Alvarez, P., 1986. Using discriminant analysis to characterize spanish variety white wines. en "The Shelf Life of Foods and Beverages": 186-204. Ed. Charalambous, Elsevier Sciences Publishes B.V., Amsterdam.

Cáceres, I., 1987. "Caracterización de mostos de uva para vinificación". Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Camp, J.L., 1982. Compte rendu d'expériences sur la refrigeration. *Rev. Franc. Enol.* 32: 47-50.

Cantarelli, C., 1964. Prevention des précipitations tartriques. *Ann. tech. Agr.* 12: 343-356.

Castino, M., Di Stefano, R., 1976. Frazionamento degli acidi fenolici dei vini bianchi per gel filtrazione. *Riv. Vitic. Enol.* 7.

Clutton, D.V., 1975. Tartrates in wine. *Process Biochem.* 2: 25-28.

Colagrande, O., Silva, A., 1981. Considerazioni analitiche e tecnologiche sui diversi costituenti azotati dei vini spumanti. *Ind. Bevande*, 55: 349-363.

Colagrande, O., Mazzoleni, V., Silva, A., Colm, S., 1984. L'impiego del freddo per la stabilizzazione dei vini nei confronti del bitartrato di potasio. In "Vino: bevanda e alimento". Atti del 2º Simposio internazionale sul vino: 183-192. Chiriotti Editori. Pavia. Junio, 1984.

Colagrande, O., Silva, A., 1987. Evolution des protéines et des polysaccharides au cours de la preparation des vins mousseux. Assise Internazionali della Vite e del Vino. Roma.

Cordonnier, R., 1966. Etude des protéines et des substances azotées. Leur evolution au cours des traitements oenologiques. Conditions de la stabilité proteique des vins. *Bull. O.I.V.*, 430: 1475-1489.

Correa, I., Polo, M.C., Azigo, L., Ramos, R., 1988. Separation des protéines des mouts de raisin au moyen de techniques electrophoretiques. *Conn. Vigne vin*, 22: 1-9.

Danilatos, N., Voudori-Tsoukala, M., 1986. Les vins mousseux et pétillants. Techniques d'elaboration et appréciation de la qualité. Rapport de la Grèce. *Bull. O.I.V.*, 663-664: 627-633.

Delfini, C., 1987. Correlazione fra pH, potere tampone, stabilizzazione microbiologica e sensazione acida di un vino. *Vigne Vini*, 14: 27-34.

Diemaier, V., Koch, J., Sajak, E., 1961. Bestimmung des löslichen Proteins in Most und Wein. *Z. Lebens. Untersuch. Forsch.* 116: 5-7.

Díez de Bethencourt, C., Gómez-Cordovés, C., Blanco, M., Calera, J.G., 1980. Compuestos fenólicos de pequeño peso molecular. Su influencia en la calidad de los vinagres. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 20: 247-256.

Drawert, F., Müller, V., 1973. On the differentiation and classification of proteins by electrophoresis II. Thin-Layer-Isoclectric focusing of proteins from different grape varieties. *Z. Lebens. Unter.-Forsch.*, 153: 204 - 212.

Drawert, F., Gorg, A., 1974. On the differentiation and classification of proteins by electrophoresis III. Discelectrophoretical and Iso-Electrical focusing of proteins and Enzymes of different grape varieties. *Z. Lebens. Unter.-Forsch.*, 154: 328-338.

Dubordieu, D., Lefebvre, A., Riberau-Gayon, P., 1976. Influence d'un traitement physique d'ultradispersion sur la filtration des vins. *Conn Vigne Vin*, 10: 73-92.

Dubordieu, D., Llauberes, R.M., Ollivier, C., 1986. Estimation rapide des constituants macromoléculaires des mouts et des vins par chromatographie liquide haute pression (CLHP) de tamisage moléculaire. *Conn. Vigne Vin* 20: 119 - 123.

Dunsford, P., Boulton, R., 1981. The kinetics of potassium crystallization from table wines. I. Effect of particle size, particle surface area and agitation. *Am. J. Enol. Vitic.* 32: 100-105.

Dunsford, P., Boulton, R., 1981. The kinetics of potassium crystallization from table wines. II. Effect of temperature and cultivar. *Am. J. Enol. Vitic.* 32: 106-110.

Echeverría, S., 1980. Contribución al estudio de vinos blancos del Penedés. II. Formas iónicas del ácido tartárico y precipitaciones del mismo. *Sem. Vitiv.* 1769-1770: 2371-2429.

Escudier, J.L., Moutonnet, M., Barillere, J.M., Benard, P., Cottureau, Ph., Audinos, R., Daumas, C., 1985. L'electrodialyse: demineralization et desacidification des mouts de raisin. Fabrication de mouts concentres rectifies. *Rev. Franc. Enol.* 22: 39-44.

Escudier, J.L., Moutonnet, M., Benard, P., 1987. Influence de l'ultrafiltration sur la cinétique de cristallisation du bitartrate de potassium des vins. *Rev. franc. Enol.*, 108: 52-57.

Escudier, J.L., Moutonnet, M., 1987. Filtration tangentielle et stabilisation tartrique des vins. II.- Apport de la microfiltration

tangentielle dans la stabilisation tartrique d'un vin rouge. *Rev. Franc. Enol.*, 109: 44-50.

Feuillat, M., Bergeret, J., 1972. Separation, concentration et analyse par electrophorese sur gel de polyacryamide de proteines solubles du raisin et du vin. *Rev. franc. Enol.* 48: 5 - 11.

Franzini, M., Leoni, L., Saitta, M., 1975. Revisione di una metodologia analitica per Fluorescenza-X basata sulla correzione completa degli effetti di matrice. *Soc. Ital. Mineral. Petrol. Rendiconti Vol. XXXI*: 365-378.

Frigerio, W.A., Gomez, P., 1986. Les vins mousseux et petillants. Techniques d'elaboration et appreciation de la qualite. Rapport de l'Argentine. *Bull. O.I.V.*, 683-684: 503-519.

Garside, J., 1971. The concept of effectiveness factors in crystal growth. *Chem. Eng. Sc.*, 26: 1425-1431.

Garside, J., Nucleation. 1982. In *Biological Mineralization and Demineralization*. pp 23-36. Ed. by Mancillas. Springer Verlag. Berlin.

Glasstone, S., 1953. *Tratado de Fisico-química*. Ed. Aguilar. Madrid.

Gomez-Cordoves, C., Hernandez, T., Diez, C., 1983. Application of HPLC to the analysis of white wines dyed with oenocyanine. II European Conference on Food Chemistry. Euro-Food Chem. II. Roma (Italia). March 15-18.

Gonzalez-Lara, R., Correa, I., Polo, M.C., Martin-Alvarez, Ramos, M., 1989. Classification of variety musts by statistical analysis of their protein pattern. *Food Chemistry*. En prensa.

Gonzalez de Llano, D., Ramos, M., Polo, M.C., 1987. Gel filtration and High-Performance liquid Chromatographic Analysis of phosphotungstic acid soluble peptides from blue cheeses. *Chromatogr.* 23: 764-766.

Gorg, A., Postel, W., Westermeyer, R., Gunther, G., 1982. Ultrathin-Layer isoelectric focusing, electrophoresis and protein mapping of must and wine proteins. Recent Dev. Food Analysis. Proceedings European Conference Food Chemistry, 4: 264-269.

Hagen, K., 1979. Les precipitations tartriques. *Rev. Franc. Enol.* 74: 63-69.

Hames, B.D., 1981. An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. En "Gel electrophoresis of proteins. A practical approach". Editado por B.D. Hames y D. Rickwood. IRL Press. Oxford.

Haushofer, Szemelik, 1973. Die Forderung der Weinstein ausscheidung bei Weinen durch zugabe von impfkristallen, kratzen an glass wanden und anwendung ultraschall. *Kitt. reb. wein. Klosterneuburg* 23: 259-284.

Heatherbell, D., Ngaba, P., Fombin, J., Watson, Jr., Garcia, Z., Flores, J., Hsu, J. 1985. Recent developments in the application of ultrafiltration and protease enzymes to grape juice and wine processing. Proceeding of: "The International Symposium on Cool Climate Viticulture and Enology", pp: 417-445. Editado por D.A. Heatherbell, P.B. Lombard, F.V. Bodyfelt y S.F. Price. Oregon State University. Oregon.

Hidalgo, J. 1983. Técnicas para la elaboración de espumosos (I). *Vitía y Vino*. 12: 62-66.

Hidalgo, J. 1983. Técnicas para la elaboración de espumosos (II). *Vitía y Vino*. 13: 38-42.

Hidalgo, J. 1983. Técnicas para la elaboración de espumosos (III). *Vitía y Vino*. 14: 51-54.

Hillier, R.M., 1976. The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Res.* 43: 259-265.

Hsu, J.C., Heatherbell, D.A., 1987. Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice and wine. *Am.J. Enol. Vitic.* 38: 6 - 10.

Interesse, F.S., Alloggio, V., Lamparelli, F., D'Avella, G., 1987. Proteins in musts estimated by size-exclusion HPLC. *Food Chemistry*, 23: 65-78.

Ivanov, T., Hachkov, D., Slavoski, M., 1986. Les vins mousseux et pétillants. Techniques d'elaboration et appreciation de la qualité. Rapport de la Bulgarie. *Bull. O.I.V.*, 663-664: 541-548.

Jancic, S.J., Grootsholten, P.A.M., 1985. Industrial crystallization. Delft University Press. Delft. Holanda.

Kerenyi, Z., 1986. Les vins mousseux et pétillants. Techniques d'elaboration et appreciation de la qualité. Rapport de la Hongrie. *Bull. O.I.V.*, 663-664: 634-640.

Kirchova, E.K., Djarova, M., 1978. On the kinetics of crystallization of zinc oxalate dihydrate by precipitation. En "Industrial crystallization 78". Ed por Jong E. J., Jancic S.J.. North-Holland Publishing.

Kliwer, W.M., Howarth, L., Omori, M., 1967. Concentrations of tartaric acid and malic acids and their salts in *Vitis Vinifera* grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 18: 42-54.

Koch, J., Sajak, E., 1959. A review and some studies on grape protein. *Am. J. Enol. Vitic.* 10: 114-123.

Koch, J., Schiller, H. 1964. Kinetics der Kristallisation von Weinstein. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* 124: 180-183.

- Laemli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 227: 680-685.
- Laminkara, O., 1987. The proteins of muscadine grapes. *J. Food Sci.*, 52: 483-484.
- Landolt- Bornstein, K.R. 1959. Elektrische - Eigenschaften II. 72 teil. Springer- Verlag. Berlin.
- LLaguno, C., 1983. Estabilización de vinos. En "Enología:temas actuales". pp 219-245. Ed. LLaguno, C. ANQUE. Madrid.
- Lowry O.E., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Lockwood, D.J., Labbe, H.J., Gardner, G.J.. 1984. Spectroscopy analysis of wine crystals. *Am. J. Enol. Vitic.*, 35: 178-182.
- Margheri, G., Gianotti, L., Pellegrini, R., Mattarei, C. 1984. Vini spumanti di qualità metodo champenois. *Vini d'Italia* 6: 57-63.
- Martin, P., Polo, M.C., Cabezudo, M.D., Dabrio, K.V., 1984. Dansyl aminoacids behaviour on a radial pak C18 column derivatization of grape wine musts, wines and wine vinegars. *J. Liquid. Chromatogr.* 7: 539-558.
- Kaujean, A., Malherbe, V., Dupont, A. 1984. Controle des traitements par le froid artificiel des vins de Champagne. efficacité des traitements selon la nature du collage des vins. *Conn. Vigne Vin*, 18: 49-65.
- Kaujean, A., Sausy, L., Vallee, D., 1985. Determination de la sursaturation en bitartrate de potassium d'un vin. Quantification des effets colloïdaux protecteurs. *Rev. Franc. Enol.*, 100: 39-50.
- Kaujean, A., Vallee, D., Sausy, L., 1986. Influence de la granulometrie des cristaux de tartre de contact et des traitements et collages sur la cinetique de cristallisation du bitartrate de potassium dans les vins blancs. *Rev. Franc. Enol.*, 104: 34-41.
- Mattick, I.R., Shaulis, E.J., Moyer, J.C., 1972. The effect of potassium fertilization on the acid content of concord grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 23: 26-30.
- Maier, W., 1986. Les vins mousseux et pétillants. Techniques d'elaboration et appréciation de la qualité. Rapport de l'Autriche. *Bull. O.I.V.*, 563-664: 527-540.
- Millies, K., 1975. Protein stabilization of wine using silica sol/gelatin fining. *Mitteilungsblatt der GDCH-Fachgroup. Lebensm. Gerich. Chemie*, 22: 50-53.
- Moretti, R.E., Berg, H.V., 1965. Variability among wines to protein clouding. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 69-78.

Morris, J.R., Cawthon, D.L., Fleming, J.W., 1980. Effects of high rates of potassium fertilization on raw product quality and changes in pH and acidity during storage of concord grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 323-328.

Morris, J.R., Sims, C.A., Cawthon, D.L., 1983. Effects of excessive Potassium levels on pH acidity and color of fresh and stored grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 34: 35-39.

Mullin, J.W., Amatavivadhana, A., 1967. Growth kinetics of ammonium and potassium dihydrogen phosphate crystals. *J. Appl. Chem.*, 17: 151-156.

Mullin, J.W., 1978. Crystal growth in pure and impure systems, pag. 93-103. In "Industrial Crystallization 78". Edited by Jong E. J., Jancic S.J.. North-Holland Publishing Company, 1979.

Musil, L. y Vlk, J. 1978. Role of the geometry in the hydrodynamics of circulating slurries in a stirred Crystallizer. In "Industrial Crystallization 1978". Ed. Jong y Jancic. North Holland Publishing Company.

Naumova, T.E., Stavikova, Z.A., Zhernina, L.S., Chlochina, L.I., Stjepin, B.D., 1979. Study of Homogeneous and Heterogeneous Nucleation Processes for Substances of Different Crystalline Structure. pag 37-43. In "Industrial Crystallization 78". Edited by Jong E. J., Jancic S.J.. North-Holland Publishing Company.

Nielsen, A.E., Schönel, O. 1971. Interfacial tensions electrolyte crystal-aqueous solution from nucleation data. *J. Cryst. Growth* 11: 233-242.

Nielsen, A.E., 1981. Theory of Electrolyte Crystal growth. The parabolic rate law. *Pure Appl. Chem.* 53: 2025-39.

Nielsen, A.E., Christoffersen, J., 1982. The mechanism of Crystal Growth and Dissolution. In "Biological Mineralization and Demineralization". Edited by G.H. Nancollas. Springer-Verlag, Berlin.

Nielsen, A.E., 1984. Electrolyte crystal growth mechanism. *J. Crystal Growth*. 67: 289-310.

Ough, C.S., 1969. Rapid determination of proline in grapes and wines. *J. Food Sci.* 34: 228-230.

Ough, C.S., Anelli, G., 1979. Zinfandel grape juice protein fractions and their amino acid makeup as affected by crop level. *Am. J. Enol. Vitic.* 30: 8-10.

Ong, B.Y., Nagel, C.W. 1978. Hydroxycinnamic acid-tartaric acid ester content in mature grapes and during the maturation of grapes and during maturation of white Riesling grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 29: 277-281.

Paronetto, L., 1978. Le precipitazioni tartariche del vino. I. Fattori che regolano i fenomeni della cristallizzazione e la solubilità dei sali tartarici. *Vigne Vini*, 5(4): 33-39.

Paronetto, L., 1978. Le precipitazioni tartariche del vino. II. Le tecniche di stabilizzazione. Gli scambiatori di ioni. *Vigne Vini* 5(5): 25-30.

Paronetto, L., 1978. Le precipitazioni tartariche del vino. III. Le tecniche di stabilizzazione. Gli inibitori della cristallizzazione. L'acido metatartrico. *Vigne Vini* 5(6-7): 23-28.

Peri, C. Pompei, C., 1971. An assay of different phenolic fractions in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 22: 55-58.

Perin, J. 1982. La stabilisation des vins par le froid en Champagne. *Rev. Franc. Enol.*, 27: 105-108.

Perry, R.H., Chilton, C.H., 1974. *Manual del Ingeniero Químico*. Ed. McGraw-Hill. México.

Peynaud, E., 1964. L'acido metatartrico nella stabilizzazione dei vini. *Tecn. Alim.* 1.

Pilone, B.F., Berg, H.W., 1965. Some factors affecting tartrate stability in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 195-211.

Plane, R.A., Mattick, L.R., Veirs, L.D., 1980. An acidity index for the taste of wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 265-68.

Polo, M.C., Herraiz, M., Cabezudo, M.D. 1983. A study of nitrogen fertilization and fruit maturity as an approach for obtaining the analytical profiles of wines and wine grapes. En "Instrumental analysis of foods". Vol. 2. pag 357-374. Ed. G.Charalambous y G. Inglett. Academic Press, Inc. New York.

Polo, M.C., Barahona, F., Caceres, I., 1986. Dosage par chromatographie liquide haute performance des principaux acides organiques du vin. *Conn Vigne Vin* 20: 175-187.

Postel, V. Prassch, E. 1977. The contact process, a new possibility for tartar stabilization. *Weinwirtschaft*. 113: 871-877.

Prass, G., 1986. Les vins mousseux et pétillants. rapport de l'Australie. *Bull. O.I.V.*, 663-664: 520-533.

Quinsland, D., 1978. Identification of common sediments in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 29: 70-71.

Radola, B.J., Richter, O.H.K., 1972. Physico-chemical studies on soluble grape proteins. I. Charge properties. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 2: 41-50.

Rhein, D., Kerardt, F., 1979. Tartrate stabilization by the contact process. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30: 265-271.

Reglero, G.. 1985. "Estudio sobre los distintos tipos de columnas para Cromatografía de gases. Aportación al conocimiento de la relación naturaleza química-actividad sensorial de los componentes del aroma del vino. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Sección Químicas. Universidad Autónoma de Madrid.

Riberau-Gayon, J., Peynaud, E., 1971. *Traité d'Ampelologie. Sciences et techniques de la vigne*. Ed. Dunod, Paris.

Riberau- Gayon, J., Peynaud, E., Riberau-Gayon, P., Sudraud, P.. 1975. *Traité d'Enologie. Sciences et techniques du vin. Caracteres des vins. Maturation du raisin. Levures et bacteries. II*. Ed. Dunod, Paris.

Riberau- Gayon, J., Peynaud, E., Riberau-Gayon, P., Sudraud, P.. 1976. *Traité d'Enologie. Sciences et techniques du vin. Vinifications. Transformation du vin. III*. Ed. Dunod, Paris.

Riberau- Gayon, J., Peynaud, E., Riberau-Gayon, P., Sudraud, P.. 1977. *Traité d'Enologie. Sciences et techniques du vin. Clarifications et stabilisation. Materiel et installations. IV*. Ed. Dunod, Paris.

Riberau- Gayon, J., Peynaud, E., Riberau-Gayon, P., Sudraud, P.. 1982. *Tratado de Enología. Ciencias y técnicas del vino. Analisis y control de los vinos*. Ed. Dunod, Paris.

Robertson, W.G., 1982. The solubilty concept. In "Biological Mineralization and demineralization. Ed. Mancollas, Springer Verlag, Berlin.

Robinson, R.A., Stokes, R.H. 1955. *Electrolyte solution*. London Butterwoths. Sc. Publ.

Rodriguez, R. 1976. Crystal growth kinetics of NaCl from solution. In "Industrial Crystallization 76", pag 263-268. Editado por J.W. Mullin, Plenum Press New York 1976

Rodriguez, M., 1982. *La Difracción de Rayos X*. Ed. Alhambra. Madrid.

Rodriguez, R. Correa, I. Castro, J.J. 1987. A new method for the stabilisation of wines respect to the potassium bitartrate precipitation. II World Congress of Food Technology. Barcelona.

Rodriguez, R. Correa, I., 1988. Structural, morphological and kinetics aspects of potassium hydrogen tartrate (KHT) precipitation from wines and alcoholic solutions. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 169-179.

Rufner, H.P., 1982. Metabolism of tartaric and malic acids in Vitis: A review-Part A. *Vitis*, 21: 247-259.

Samoilov, Y., 1965. *Structure of aqueous electrolyte solutions*. Consultant Bureau. New York.

Scanzola, M.E., 1956. Sur un produit inhibiteur de la cristallization du tartre dans les vins. *Ann. Fals. Fraud.* 49: 159-163.

Scott, R.S., Anders, T.G., Humm, H., 1981. Rapid Cold Stabilization of wine by filtration. *Am. J. Enol. Vitic.* 32, 138-143.

Serrano, M., Sudraud, P., Riberau-gayon, P. 1983. Prevention des precipitations tartriques dans les vins au moyen du traitement en continu par le froid. *Conn. Vigne Vin.* 17: 121-136.

Silva, A., Mazzoleni, V., Bianchi, F., 1984. Valutazione dei sedimenti cristallini del vino mediante la microscopia elettronica. In "Vino: bevanda e alimento". Atti del 29 Simposio internazionale sul vino: 183-192. Chiriotti Editori. Pavia. Junio, 1984.

Silva, A., Mazzoleni, V., 1985. La stabilizzazione dei vini nei confronti del bitartrato di potasio. *Vigne Vini.* 2: 13-17.

Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.

Sommers, T.C., Ziemelis, G., 1972. Interpretations of ultraviolet absorption in white wines. *J. Sci. Ed. Agric.* 23: 441-453.

Sommers, T.C., Ziemelis, G., 1973. Direct determination of wine proteins. *Am. J. Enol. Vitic.*, 24: 47-50.

Sommers T.C., Ziemelis, G., 1973. The use of gel analysis in evaluation of bentonite fining procedures. *Am. J. Enol. Vitic.*, 24: 51-54, 1973.

Sommers, T.C., 1975. In search of quality of red wines. *Food Tech. Aust.* 22: 49-56.

Storey, R., 1987. Potassium Localization in the grape berry pericarp by energy-dispersive X-ray microanalysis. *Am J. Enol. Vitic.* 38: 301-309.

Strey, R., Kahlweit, M., 1978. On the induction period in the precipitation of ionic crystals from solutions. In "Industrial Crystallization 78". edited by Jong E. J., Jancic S.J., North-Holland Publishing Company, 1979.

Strickland- Constable, R.F. 1976. Collision breeding from solution or melt. In "Industrial Crystallization", pag 33-40. Edited by J.W. Mullin. Plenum Press New York. 1976.

Stummer, W., Morgan, J.J., 1983. Aquatic chemistry: An introduction. Emphasizing chemical equilibria in natural waters. Ed. John Wiley & sons inc. Nueva York.

Suarez, M.A., Polo, M.C., Llaguno, C., 1979. Etude de la composition de vins mousseux pendant la prise de mousse au cours du vieillissement en bouteilles. *Conn. Vigne Vin.* 13: 199-217.

Trost, G., 1985. Tecnologia del vino. Ed. Omega. Barcelona.

Tyson, P.J., Luis, E.S., Day, W.R., Walker, B., Lee, T.H., 1981. Research note: Estimation of soluble protein in must and wine by high-performance liquid chromatography. *Am.J. Enol. Vitic.* 32: 241-243.

Usseglio-Tomasset, L., 1977. Causas y mecanismos de las alteraciones físico-químicas de la limpidez de los vinos. II semana interacional de vino. Ed. Organización Sídical Provincial de Cadiz. Sevilla.

Usseglio-Tomasset, L., Di Stefano, R., 1977. Osservazioni sui costituenti azotati dei colloidi dei mosti, dei vini e dei colloidi ceduti dal lievito al substrato fermentativo. *Riv. Vitic. Enol.* 11: 3-20.

Usseglio-Tomasset, L., Bosia, P.D., 1978. Determinazione delle costanti di dissociazione dei principali acidi del vino in soluzione idroalcoliche di interesse enologico. *Riv. Vit. Enol.*, 31: 380.

Usseglio Tomasset, L., 1978. *Chimica enologica*. Ed. AEB, Brescia.

Usseglio Tomasset, L., 1979. Osservazioni su sconcertanti calcoli per valutare la stabilità dei vini confronti del cremortartaro. *Vini d'Italia*, 31: 231-238.

Usseglio-Tomasset, L. Bosia, P.D. 1982. Chiarimenti sperimentali sullo stato di saturazione del bitartrato potassico nei mosti e nei vini. *Riv. Vit. Enol.*, 35: 261-296.

Usseglio-Tomasset, L., 1986. Les vins mousseux et pétillants. Techniques d'elaboration et appréciation de la qualité. Rapport de l'Italie. *Bull. O.I.V.*, 263-664: 641-657.

Veintemillas, S. 1986. "Crecimiento cristalino a partir de disoluciones hirvientes". Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid.

Vialatte, C., 1984. Test de stabilité bitartrate potassium (boulton). *Rev. Franc. Oenol.* 34: 20.

Vidal, K., Blouin, J., 1978. Dosage colorimétrique rapide de l'acide tartrique dans les mouts et les vins. *Rev. Franc. Oenol.* 28: 39-46.

Villetaz, J.C., Amado, R., Neukom, H., 1982. Investigation of colloid substances in must and wine. Proceedings of the First European Conference on Food Chemistry (EURO FOOD CHEM I). Ed. Verlag Chemie. Basel.

Wejnar, R. 1971. Etude de l'influence de l'acide tartrique et de l'acide malique sur le pH du vin. *Conn. Vigne Vin*, 5: 535-562.

Wucherpfennig, K., 1978. Possibilités d'application de procédés utilisant des vins (Ultrafiltration, Osmose inverse, Electrodialyse). *Ann. Technol. Agric.* 22: 319-331.

Vucherpennig, K., 1980. Possibilités d'utilisation de processus membranaires dans l'industrie des boissons (Osmose inverse, ultrafiltration, électrodialyse). Bull. O.I.V., 52: 187-208.

Wurdig, G., Muller, Th., Friedrich, G., 1982. Methode pour caracteriser la stabilité du vin vis-a-vis du tartre par détermination de la température de saturation. Bull. O.I.V., 61: 220-228.

Yokotsuka, K., Yoshii, K., Aihara, T., Kushida, T., 1977. Isolation and characterization of Proteins from juices, musts and wines from Japanese grapes. J. Ferment. Technol. 55: 510-515.

Yokotsuka, K., Kato, A., Kushida, T., 1978. Microdetermination of proteins in juices and wines by trichloroacetic acid (Perchloric acid)-dye method. (chemical studies on coloring and flavoring substances in Japanese grapes and wines (VIII)). J. Ferment. Technol. 56: 606-610.

Yokotsuka, K., Nozaki, K., Kushida, T., 1983. Turbidity formation caused by interaction of must proteins with wine tannins. (Chemical studies on coloring and flavoring substances in Japanese grapes and wines (XVII)). J. Ferment. Technol., 61: 413-416.